Postverlagsort Berlin

ZEITSCHRIFT FÜR ZELLFORSCHUNG UND MIKROSKOPISCHE ANATOMIE

HERAUSGEGEBEN UND REDIGIERT VON

W. BARGMANN
KIEL

B. SCHARRER
NEW YORK

J. SEILER
ZÜRICH

55. BAND, 4. HEFT

MIT 85 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 26. OKTOBER 1961)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1961

Z. Zellforsch.

Preis DM 49.80

Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie

Begründet 1924 unter dem Titel: Zeitschrift für Zellen- und Gewebelehre. Redigiert von *R. Goldschmidt* und *W. von Möllendorf*. Bd. 2—23 (1938). Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie. (Bd. 1—20), 1934 als: Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie Abteilung B) herausgegeben von *R. Goldschmidt, W. von Möllendorff, H. Bauer, J. Seiler*. Bd. 29—33 (1944) Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie Abteilung A. Allgemeine Zellforschung und mikroskopische Anatomie. Herausgegeben und redigiert von *W. von Möllendorff* und *J. Seiler*, Berlin, Springer. Bd. 34—35 (1948—1950) Springer, Wien, ab Bd. 36 Springer, Berlin, ab Bd. 34 ohne den Untertitel Abteilung A, Allgemeine Zellforschung usw.

Ab Bd. 2 (1925) mit dem Untertitel: Fortsetzung des SCHULTZE-WALDEYER-HERTWIGschen Archivs für mikroskopische Anatomie. [Dieses wurde begründet 1864. Bd. 1—13 (1876) herausgegeben von *Max Schultze*; Bd. 13, Heft 4, bis Bd. 35 (1890) herausgegeben von *v. La Valette St. George, W. Waldeyer*; Bd. 36—43 (1894) herausgegeben von *O. Hertwig, v. La Valette St. George, W. Waldeyer*. Ab Bd. 44 als Archiv f. mikroskopische Anatomie und Entwicklungsgeschichte, ab Bd. 77—95 (1910—1922) in 2 Abteilungen. Bd. 1—95, Bonn, Cohen. Ab Bd. 96 Berlin, Springer. Fortsetzung Bd. 98—104 (1923—1925) Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik. Herausgegeben von *W. Roux, H. Braus, H. Spemann*.]

Die Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie steht Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der beschreibenden und experimentellen Zellen- und Gewebelehre sowie dem Gebiet der mikroskopischen Anatomie des Menschen und der Tiere offen, wobei Arbeiten mit funktionellem und experimentellem Inhalt bevorzugt werden.

Arbeiten karyologischen Inhalts werden an die Zeitschrift „Chromosoma", Arbeiten zur histochemischen und histophysikalischen Grundlagenforschung, insbesondere ihrer Methodik, an die Abteilung „Histochemie" weitergeleitet.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung rascher Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind. Der Autor verpflichtet sich, sie auch nachträglich nicht an anderer Stelle zu publizieren. Mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag geht das Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder einschließlich des Rechts der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung an den Verlag über. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0.30 pro Seite zu verwenden. *Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.*

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Alle Manuskripte sind zu senden und Anfragen zu richten an:

Prof. Dr. W. Bargmann, Kiel, Anatomisches Institut der Universität, Neue Universität, Eingang F 1,

Prof. Dr. Berta Scharrer, Albert Einstein College of Medicine, Dept. of Anatomy, Eastchester Road and Morris Park Avenue, New York 61, N.Y., USA,

Prof. Dr. J. Seiler, Zürich 6, Sonneggstr. 45.

Springer-Verlag

Heidelberg 1, Postfach 3027, Fernsprecher 27901, Fernschreibnummer 04-61723
Berlin-Wilmersdorf, Heidelberger Platz 3, Fernsprecher 830301, Fernschreibnummer 01-83319

55. Band

Inhaltsverzeichnis

4. Heft

Seite

SCHMIDT, W. J., Histologische Untersuchungen an Papageienfedern mit gelbem eigenfluoreszierenden Pigment. Mit 12 Textabbildungen 469

THOENES, W., Zur Feinstruktur der Macula densa im Nephron der Maus. Mit 7 Textabbildungen 486

BJÖRKMAN, N., and B. FREDRICSSON, The bovine oviduct epithelium and its secretory process as studied with the electron microscope and histochemical tests. With 13 Figures in the Text 500

KNOCHE, H., Morphologisch-experimenteller Beitrag zum lichtmikroskopischen Bau des vegetativen Nervensystems. II. Mitteilung: Die Endigungsweise der postganglionären Nervenfasern. Mit 17 Textabbildungen 514

NEBEL, B. R., and E. M. HACKETT, Synaptinemal complexes in primary spermatocytes of the mouse: the effect of elevated temperature and some observations on the structure of these complexes in control material. With 4 Figures in the Text 556

VENKOVSKI, T. D., Notes cytologiques sur la glande sus-parotidienne du rat albinos. Dimorphisme sexuel, vacuoles cytoplasmiques et vésicules intranucléaires. Avec 5 Figures dans le Texte 566

BARGMANN, W., und A. KNOOP, Weitere Studien am Saccus vasculosus der Fische. Mit 16 Textabbildungen 577

SCHWARZ, W., Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Chordazellen von *Petromyzon*. Mit 8 Textabbildungen 597

RIEDEL, B., Aufnahme von Jod^{131} in Schilddrüsengewebekulturen bei Verwendung verschiedener Nährmedien. Mit 3 Textabbildungen 610

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Zeitschrift für Zellforschung 55, 469—485 (1961)

Aus dem Zoologischen Institut Gießen

HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN PAPAGEIENFEDERN MIT GELBEM EIGENFLUORESZIERENDEN PIGMENT

Von

W. J. Schmidt

Mit 12 Textabbildungen

(Eingegangen am 11. Juni 1961)

Inhalt

Seite

I. Einleitung 469
II. Untersuchungsverfahren 471
III. Lichtbrechung, Doppelbrechung und Dichroismus der spezifisch pigmentierten Federteile 473
IV. Fluoreszenz und Bifluoreszenz der spezifisch pigmentierten Federteile 476
1. Fluoreszenz im natürlichen Zustande der Feder 476
2. Fluoreszenz der partiell entpigmentierten Feder 479
3. Bifluoreszenz der Feder 481
Anhang: Sekundärfluoreszenz und -bifluoreszenz bei Federn 483
Zusammenfassung 484
Literatur 485

I. Einleitung

Fluoreszenz bedeutet bekanntlich die Fähigkeit eines Objektes, absorbiertes Licht in solches anderer Frequenz (Farbe) zu verwandeln. Dabei ist im allgemeinen (Stokessche Regel) die Wellenlänge des „erregten" Lichtes größer als die des „erregenden". Aus diesem Grunde benutzt man zum Hervorrufen von Fluoreszenz ultraviolettes (oder blaues) Licht. (Näheres zur physikalischen Seite siehe bei de Lerma 1958).

Mancherlei tierische Objekte zeigen in ihrem natürlichen Zustande Fluoreszenz, sog. „*Primär- oder Eigenfluoreszenz*"; viele aber können durch Einlagerung fluoreszierender Stoffe künstliche, „*sekundäre*" Fluoreszenz erlangen. Die hierzu geeigneten „*Fluorochrome*", die heute in größerer Auswahl zur Verfügung stehen, sind von sehr verschiedener chemischer Natur, besitzen meist schwache Eigenfarbe, liefern aber oft sehr kräftige Fluoreszenz, deren Farbton bei der gleichen Substanz durch mancherlei Umstände (siehe Scharf 1958) modifiziert werden kann.

Bei einigen *doppelbrechenden* Objekten mit Sekundärfluoreszenz, so bei Zellulosefasern (Ziegenspeck 1949) aber auch Nerven (Scharf 1956) erwies sich das Fluoreszenzlicht als *linear polarisiert* und es zeigte nach den beiden wirksamen Schwingungsrichtungen Unterschiede der Intensität und (oder auch) der Farbe: „*Difluoreszenz*" (Ziegenspeck 1949). Dieses Phänomen, sprachlich richtig als *Bifluoreszenz* zu bezeichnen, wurde bisher bei *Primär*fluoreszenz noch nicht beobachtet.

Einen bemerkenswerten Fall von Primärfluoreszenz im Tierreich hat O. Völker (1936, 1937, 1940) bei gewissen *blaßgelb pigmentierten Federn vieler Papageien* von weltweiter Verbreitung entdeckt: Die so gefärbten Federteile leuchteten im ultravioletten Licht der Quarzlampe, das mit UG 2-Glas von Schott u. Gen.,

Jena, filtriert wurde, prachtvoll *gelb* bis *grün* auf. Die folgenden Einzelheiten werden vornehmlich nach Völkers Zusammenfassung (1960) gegeben:

Das fluoreszierende Pigment, das unter dem Mikroskop dilut in der Hornmasse verteilt erscheint, findet sich nur bei Konturfedern, und zwar ihren Federästen und -strahlen, niemals am Federschaft. Nicht pigmentierte Stellen zeigen die schwache Blaufluoreszenz, wie sie mancherlei Proteinstrukturen zukommt. An einer Stirnfeder vom Wellensittich, *Melopsittacus undulatus* (Shaw), unterscheidet Völker (1936) nach dem Fluoreszenzbild 3 Zonen: Schaft und pigmentfreie Basaldune leuchten schwach blau, die anschließende mittlere rhombische Zone, im Tageslicht intensiv gelb, wirkt matt samtartig, während der dritte Abschnitt, die strohgelben fast radienlosen Rami, prachtvoll goldgelb fluoreszieren.

Benetzte Völker (1936) ein solches Federchen mit konzentrierter Schwefelsäure, so wurde nur die mittlere intensiv gelbe Zone blau („Lipocyanreaktion"), die distale fluoreszierende aber behielt ihre Farbe. Dieses Verhalten bestätigte sich allgemein für die fluoreszierenden Papageienfedern und läßt sie mühelos von solchen mit nicht fluoreszierendem gelben (und rotem) Polyenfarbstoffen unterscheiden.

Am Tageslicht kann das fluoreszierende Pigment durch seine schwefel- oder fahlgelbe Farbe erkannt werden — sofern es allein vorliegt. Treten aber dazu andere Farberzeuger (etwa Blaustruktur, Melanin), oder liegt ein Gemisch mit anderen gelben Farbstoffen vor, so bleibt nurmehr der Nachweis mit Ultraviolettlicht.

Völker unterscheidet 3 Typen der hier in Rede stehenden Fluoreszenz:

I Goldgelb (Beispiel *Cacatua*);

II Schwefelgelb (Beispiel *Melopsittacus*);

III Grün (Beispiel *Palaeornis*).

Am stärksten findet er die Fluoreszenz bei vielen *Platycercus*-Arten.

Das Fluoreszenz erregende Licht umfaßt den Spektralbereich von etwa 302 mμ bis zur Grenze des sichtbaren Lichtes; das erregte Spektrum erstreckt sich von Blau bis Rot mit zwei oder drei dunklen Streifen im Grün.

Federn in organischen Lösungsmitteln und ebenso in verdünnten Säuren (z.B. Salz- und Schwefelsäure) zeigen nach Völker die Fluoreszenz unverändert; in *verdünnten Laugen* (z.B. Kalilauge) dagegen *verschwindet die Fluoreszenz* innerhalb einiger Sekunden, *stellt sich aber beim Neutralisieren* (z.B. mit Salzsäure) in ursprünglicher Stärke und Farbe *wieder her*.

In anderen Teilen des Papageienkörpers ließ sich der fluoreszierende gelbe Farbstoff nicht nachweisen.

Bisher ist es nicht gelungen, dieses Pigment in unverändertem Zustande aus den Federn zu extrahieren und der chemischen Analyse zugänglich zu machen.

In der folgenden Arbeit werden die fluoreszierenden Federn einer *histologischen* Analyse unterzogen, und zwar durch vergleichende Untersuchung im *gewöhnlichen Licht*, zwischen *gekreuzten Polars* und im *Fluoreszenzmikroskop*, sowohl in ihrem natürlichen Zustande als auch nach gewissen Eingriffen, insbesondere partieller Extraktion des Pigmentes. Hierzu dienten kleine Federproben von drei Papageien, deren Fluoreszenz bereits von Völker festgestellt war: *Melopsittacus undulatus*, *Cacatua citrinocristata*, *Platycercus adscitus palliceps* — die ich der Freundlichkeit des Herrn Professor Völker (Gießen) verdanke.

II. Untersuchungsverfahren

Zur mikoskopischen Untersuchung der *Fluoreszenz* im Durchlicht bediente ich mich der *Quecksilberhöchstdrucklampe* mit dem CS 150-Brenner von Philips, der durch E. Leitz dem Mikroskop angepaßt ist, in Verbindung mit einem *Polarisationsmikroskop* (Ortholux von E. Leitz). Das Licht wurde im Lampenstutzen mit einem UG 1-Glas von 4 und einem zweiten von 2 mm Dicke gefiltert (beide können auch einzeln benutzt werden) und dazu noch mit einer etwa 12 mm dicken Schicht 5%iger Kupfersulfatlösung (Restabsorption von Rot) in Küvette auf demFuß des Mikroskopes. Damit gelangte nur ultraviolettes Licht über den Spiegel durch den Kondensor auf das Objekt und regte es zur Fluorescenz an, so daß es (im wesentlichen) wie ein Selbstleuchter von Objektiv und Okular abgebildet wurde. Das vom Objekt nicht absorbierte, durchgelassene Ultraviolett und ebenso jenes aus dem freien Sehfeld kommende — beide lösen Fluoreszenz in den Augenmedien aus — muß durch ein unten dem Okular angeschraubtes UV-Sperrfilter (Euphosglas von 2 oder 1,2 mm Dicke) absorbiert werden. (Näheres bei Gottschewsky 1958.)

Zur Beobachtung der *Bifluoreszenz* wurde der drehbare Tubusanalysator im Mikroskop eingeschaltet und seine Durchlaßrichtung der einen und dann der anderen Schwingungsrichtung des Objektes parallel gestellt, so daß die beiden linearpolarisierten Anteile des Fluoreszenzlichtes nacheinander zur Wirkung kommen. Das Objekt wird also in seinen beiden *Normallagen* geprüft (ganz so wie man bei der Untersuchung des Dichroismus im sichtbaren Licht vorgeht). Die Normallagen sind zwischen gekreuzten Polars als die beiden Auslöschstellungen aufzusuchen, geben sich aber bei kräftiger Bifluoreszenz ohne weiteres als die beiden Extreme im Verhalten der Fluoreszenz zu erkennen. Ist der Analysator nicht drehbar, so wird das Objekt mittels des Tisches in die Normallagen gebracht. Man kann zur Beobachtung der Bifluoreszenz auch ein *Dichroskopokular* benutzen, wie es von verschiedenen Herstellern in wechselnder Ausführung geliefert wird. Das Sehfeld ist in zwei Hälften geteilt, deren jede nur linearpolarisiertes Licht hindurchläßt, wobei die Schwingungsrichtungen in den beiden Hälften gekreuzt zueinander liegen. Bringt man nun ein Objekt über die Grenze der beiden Sehfelder, und zwar so daß seine Schwingungsrichtungen mit denen im Dichroskopokular übereinfallen, dann zeigt sich das Verhalten der Fluoreszenz für die beiden Schwingungsrichtungen des Objektes nebeneinander. Dieses Verfahren erlaubt in *einem* Bilde die Bifluoreszenz photographisch festzuhalten. Anderenfalls muß man 2 Aufnahmen in den beiden Normallagen des Objektes nacheinander herstellen.

Zur Untersuchung der *Doppelbrechung*, der *Lichtbrechung* und des *Dichroismus* werden die UG-Filter und die Küvette mit Kupfersulfatlösung ausgeschaltet, das Sperrfilter am Okular entfernt und je nach Bedarf Polarisator *und* Analysator oder nur der Polarisator (dieser für die Prüfung von Lichtbrechung und Dichroismus) eingeschaltet. Bei Beobachtung mit *einem* Polar oder im gewöhnlichen Licht ist die für solche Verwendung unerträgliche Helligkeit der Quecksilberlampe durch Einschalten von mehreren Mattscheiben auf das nötige Maß zu senken. Für alle Verfahren verbleibt ein *Wärmefilter* im Strahlengang.

Da die meisten *Einschlußmittel* mehr oder minder fluoreszieren, sind die Beobachtungen am günstigsten, wenn das Objekt sich in *Luft* befindet. Derartige Präparate eignen sich aber nicht zur Prüfung der Doppelbrechung oder Lichtbrechung. Daher wurden die Federteile meist in Canadabalsam eingebettet, wobei dessen Schichtdicke möglichst gering gehalten war. Man findet unter Canadabalsamproben verschiedener Herkunft solche, die nur wenig fluoreszieren. Das Kunstharz Aroclor der Monsanto Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA, ist noch geeigneter.

Paraffinöl fluoresziert bekanntlich nicht, doch sind mit diesem Medium hergestellte Präparate leicht verletzlich. Es läßt sich aber durch *festes Paraffin* ersetzen: Man bringt das Objekt unter Deckglas und setzt an dessen Rande mit einem Spatel einen Tropfen geschmolzenen Paraffins dem Objektträger auf; dieses wird kapillar unter das Deckglas eingesogen, umschließt das Objekt und erstarrt dann kristallin zu einer hauchartig milchigen Schicht. Reines Paraffin bleibt im Fluoreszenzmikroskop so gut wie unsichtbar; die Objekte aber leuchten fast so stark auf wie in Luft. Auch Paraffinschnitte des Objektes können ohne Entfernung des Einschlußmediums im Fluoreszenzmikroskop untersucht werden. Für polarisationsmikroskopische Zwecke freilich und auch für die Untersuchung der Bifluoreszenz sind derartige Präparate wegen der starken Doppelbrechung des Paraffins unbrauchbar.

Die Eigenfluoreszenz der Federn ist so stark, daß mehrhundertfache Vergrößerungen angewendet werden können; als Immersionsobjektiv diente das Fluoritsystem 1/7 a (P).

Geeignete Objekte zum Einüben auf Bifluoreszenzuntersuchungen sind feinbaulich gut orientierte *Zellulose*fasern wie Ramie oder die feinen Zellulosefäden aus den Zellen der Samenschale von *Cobaea scandens*, die nach Einweichen der reifen ausgetrockneten Samen daraus als schleimige Masse hervorquellen. Beide Objekte sind sehr stark doppelbrechend, löschen abgesehen von Störungen einheitlich aus und wirken positiv zur Länge. Man legt sie für etwa 12 Std in wäßrige Lösung von *Primulin*, *Berberinsulfat* oder *Acridin-Orange* ein, und drückt sie dann gestreckt mit Fließpapier einem Objektträger an, um die Reste der Fluorochromlösung zu beseitigen. Die Untersuchung erfolgt am besten in Luft, aber auch Canadabalsampräparate sind brauchbar. Stellt man nun die Schwingungsrichtung des allein eingeschalteten Analysators einmal parallel, das andere mal senkrecht zur Länge des Objektes und prüft so in gewöhnlichem Licht auf Dichroismus, in ultraviolettem auf Bifluoreszenz, so ergibt sich folgendes:

Tabelle. *Ramiefasern*

Farbstoff	Dichroismus	Bifluoreszenz
Primulin		Grell gelblich/Dunkel
Berberinsulfat	Gelb/Hellgelb	Leuchtend gelb/Schwach gelb
Acridin-Orange	Bräunlichgelb/Hellgelb	Gelbgrünlich/Weinrot

Die Angabe vor / bezieht sich auf das längs, die Angabe dahinter auf das quer zur Faser schwingende Licht. Das Verhalten bei Acridin-Orange-Fluorochromierung ist besonders interessant, weil dieses je nach Konzentration, p_H, Art der Absorption, Polymerisationszustand u. a. in verschiedener Tönung auftritt (s. bei Haitinger 1959), die Bifluoreszenz aber läßt unterschiedliche Farbtöne bei gleichem Zustand von Farbstoff und Objekt zum Vorschein kommen.

Das gelbe fluoreszierende Pigment von Melopsittacus, Cacatua, Platycercus wurde *Lösungsversuchen* unterworfen und ihr Ablauf im gewöhnlichen, im Polarisations- und im Fluoreszenzmikroskop verfolgt. Als Lösungsmittel dienten 10%ige *Kalilauge*, konzentrierte und verdünnte *Schwefelsäure* und *Pyridin*. Während die beiden erstgenannten Flüssigkeiten schon bei Zimmertemperatur alsbald kräftig auf das Material wirken, verlangt Pyridin Kochen des Objektes im Reagensglas mindestens während einiger Minuten.

Man kann nun den Angriff der Kalilauge und Schwefelsäure auf das gelbe Pigment unmittelbar in der betreffenden Flüssigkeit beobachten, die dem Objekt unter Deckglas zugesetzt wurde. Da aber der Lösungsvorgang mit den beiden

genannten Flüssigkeiten rasch fortschreitet, ist es zur Erlangung von Photogrammen und Dauerpräparaten besser, ihn auf dem jeweils gewünschten Zustande abzubrechen, indem das Objekt in reichlichen Alkohol versenkt und dann über Xylol zu einem Canadabalsampräparat verarbeitet wird. Wie bekannt, setzen sowohl Kalilauge wie Schwefelsäure die Doppelbrechung des Keratins beträchtlich und unter Quellung herab; aber bei nicht zu langer Einwirkung dieser Flüssigkeiten wird der Verlust an Doppelbrechung mit dem Auswaschen durch Alkohol einigermaßen wieder rückgängig gemacht, so daß am Dauerpräparat hinsichtlich der Polarisationsoptik des Keratins ähnliche Verhältnisse vorliegen, wie im natürlichen Zustande.

Das Lösungsergebnis am Pigment nach Kochen des Objektes mit Pyridin kann unter dem Deckglas in dieser Flüssigkeit selbst beobachtet werden, was freilich den Nachteil hat, daß dieses Medium ziemlich rasch verdunstet. Daher ist es besser, am Deckglasrande eines solchen Präparates Canadabalsamlösung zuzusetzen, die sich mit Pyridin mischt und schließlich erhärtet.

III. Lichtbrechung, Doppelbrechung und Dichroismus der spezifisch pigmentierten Federteile

Die Untersuchungen wurden meist an Canadabalsampräparaten von Federästen (Rami) und Federstrahlen (Radii) der genannten Papageien vorgenommen, gelegentlich auch an ganzen Federchen. Es sei erinnert, daß die *Federäste* außen aus spindeligen tangential abgeplatteten *Rindenzellen* mit längsverlaufenden positiv doppelbrechenden Tonofibrillen bestehen. Da diese Zellen im Ramus längs und parallel zueinander liegen, so löscht ein Federast zwischen gekreuzten Polars einheitlich nach der genannten Richtung aus, bei positivem optischen Vorzeichen dazu. In der Achse der Rami findet sich ein Strang von *Markzellen*; sie besitzen länglichrunde Gestalt und feinwabige Struktur, führen Luft und bieten daher im Durchlicht die rötliche Farbe trüber Medien dar, die bei Verdrängung der Luft (z. B. durch Canadabalsam) verschwindet. Der Ort der rundlichen Zellkerne ist in den Markzellen oft kenntlich. Die Doppelbrechung der Markzellen (im natürlichen Zustande) tritt gegenüber jener der Rindenzellen ganz zurück. Die *Federstrahlen* setzen sich aus einer Reihe stark abgeplatteter rechteckiger Zellen zusammen, die längs aneinandergefügt sind, wobei der oft rinnenartig gestaltete, an einer Kante dickere Strahl im ganzen sich allmählich verjüngt. Die Radien löschen zwischen gekreuzten Polars nach der Länge aus, bei positivem Vorzeichen zu dieser Richtung, woraus Längsverlauf der Tonofibrillen folgt. Manche Strahlenzellen entsenden an der Kante distalwärts gerichtete Auswüchse, „Haken", die zur Verklammerung mit den Strahlen benachbarter Äste dienen; in die Haken hinein zweigen Tonofibrillen aus dem Zellkörper ab. Zellkernorte sind im gewöhnlichen Licht an den Strahlen nicht sichtbar. Die aufeinanderfolgenden Zellen der Radii sind durch reißverschlußähnliche Interzellularstrukturen miteinander verfugt.

Die mikroskopische Betrachtung einer fluoreszierenden Papageienfeder läßt in *gewöhnlichem Licht* die Anwesenheit des Pigmentes an der gelben Farbe erkennen, die am einzelnen Strahl oder Ast gegenüber dem Aussehen der ganzen Feder freilich schwach erscheint; die Pigmentierung verrät sich nicht morphologisch, wie etwa durch Körnung, sondern zeigt sich dilut (Abb. 1a).

Die Anwesenheit des Farbstoffes ruft aber eine *Änderung der Lichtbrechung* der betreffenden Federteile hervor, die deutlich merkbar wird, wo pigmentierte und entpigmentierte Stellen aneinanderstoßen, wie an Federstrahlen, deren Pigment teilweise durch Schwefelsäure zerstört wurde. Die Lösung des Farbstoffes schreitet dabei oft von den freien Enden der Strahlen proximalwärts fort, so daß ihre Spitze schon entpigmentiert ist, wenn der basale Teil noch mehr oder minder gelben Farbstoff enthält — was freilich im Durchlicht oft nur schwierig zu kontrollieren ist. Pigmenthaltige und pigmentfreie Gebiete stoßen manchmal in quer über den Strahl verlaufender Grenze aneinander, bisweilen aber verbleibt in der Achse des Strahles ein strangartiger Pigmentrest und öfter entstehen kleine pigmentfreie Stellen an den Zellgrenzen. In all diesen Fällen erscheint — bei tiefer Einstellung des Mikroskops! — das entpigmentierte Gebiet heller als das noch pigmentführende (Abb. 2). Demnach besitzt das dunklere *pigmentierte Gebiet höhere Lichtbrechung* als das pigmentfreie. Die den ganzen Strahl umsäumende helle Beckesche Linie liegt bei tiefer Einstellung im Canadabalsam und lehrt so, daß die Brechzahl des pigmentierten wie des unpigmentierten Keratins größer ist als die des Harzes. Die Einlagerung des Pigmentes verstärkt also die Lichtbrechung des Keratins. Bei Einschalten eines Polars mit der Schwingunsrichtung längs und dann quer zum Strahl, läßt sich ein Unterschied hinsichtlich des geschilderten Verhaltens nicht wahrnehmen.

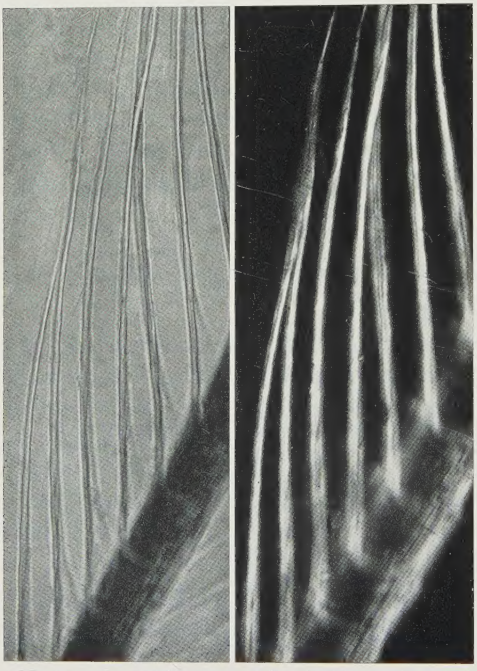


Abb. 1a u. b. *Platycercus*, Federstrahlen mit spezifischem Pigment in Canadabalsam: a gewöhnliches Licht, b Pol. ×, 200:1

Auch zwischen *gekreuzten Polars* verrät sich die Anwesenheit des fluoreszierenden Pigmentes nicht strukturell (Abb. 1b). Jedoch erscheint an kräftig gefärbten Stellen die *Polarisationsfarbe* gelblich (Äste) oder bei stärkster Pigmentierung (Strahlen) gelbgrünlich. Das Vorzeichen der Doppelbrechung ist gemäß Prüfung mit Rot-, Grün-, Blau-Filter und einem Kompensator für alle Farben positiv zur Länge der Äste und Strahlen, wenn auch die Doppelbrechung im blauen Licht stark abfällt. Infolge dieser Dispersion der Doppelbrechung machen sich beim Kompensationsversuch im weißen Licht anomale Farben bemerkbar: bläulich, olivgrün und gelblich mit steigender Subtraktion.

Weiter führt die Untersuchung der Doppelbrechung an *teilweise entpigmentierten* Federn; die vom Farbstoff befreiten Stellen zeigen nämlich viel *schwächere Doppelbrechung* als die noch pigmentierten, erscheinen im Vergleich zu diesen dunkler im Polarisationsmikroskop.

Die Entpigmentierung beginnt mit der Verdeutlichung der Zellgrenzen, wie z. B. in Abb. 3 (Melopsittacus, nach Einwirkung von Pyridin): Die einzelnen Strahlenzellen, im natürlichen Zustande (vgl. Abb. 1 b) kaum trennbar, werden nun durch dunkle schmale, schräg verlaufende Interzellularbereiche geschieden, die sich über die benachbarten Strahlen in der gleichen Richtung fortsetzen — ein für diese Zellgrenzen allgemein bekanntes Verhalten.

Abb. 4 [a) Melopsittacus, b) Cacatua, nach Einwirkung von Schwefelsäure] betrifft fortgeschrittene Entpigmentierung zwischen gekreuzten Polars unter Anwendung eines Kompensators. Bei seiner subtraktiven Wirkung werden zunächst die pigmentfreien Stellen kompensiert und überkompensiert, so daß sie sich nur wenig von dem aufgehellten Sehfeld abheben; wo aber der Farbstoff verblieb, da ist das Keratin geschwärzt, oder, wo er reichlicher ist, noch hell. So bieten die Strahlen ein sehr auffallendes Bild dar, in dem hellere und dunklere Stellen vielfach miteinander abwechseln (Abb. 4 a), im Gegensatz zu ihrem eintönigen Aussehen im natürlichen Zustand (s. S. 474, Abb. 1 b). An Stellen mit starker Pigmenteinlagerung (Abb. 4 b) sieht man bei mittlerer Kompensation geringfügige Pigmentanhäufungen im ganzen geschwärzt, dickere aber nur an ihrem Rande dunkel umsäumt, während die Mitte, noch nicht von der Kompensation erfaßt, hell sich darbietet. Das viel schwächer doppelbrechende völlig vom Farbstoff befreite Horn aber tritt in solchen Bildern nur wenig im aufgehellten Sehfeld zutage.

Abb. 2

Abb. 2. *Melopsittacus*, Federstrahlen mit spezifischem Farbstoff, durch konzentrierte Schwefelsäure teilweise entpigmentiert, in Canadabalsam, 380:1: Verstärkung der Lichtbrechung des Keratins durch Einlagerung des Farbstoffes

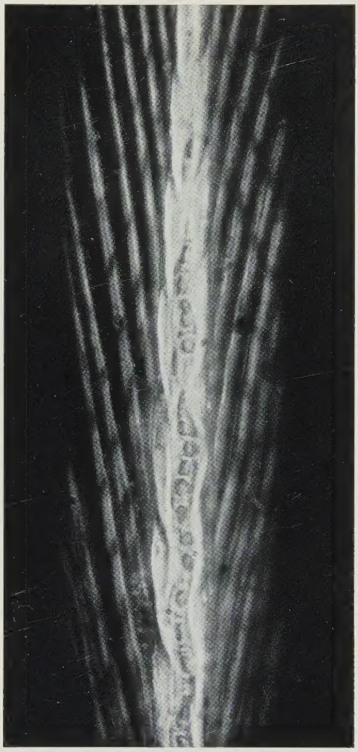


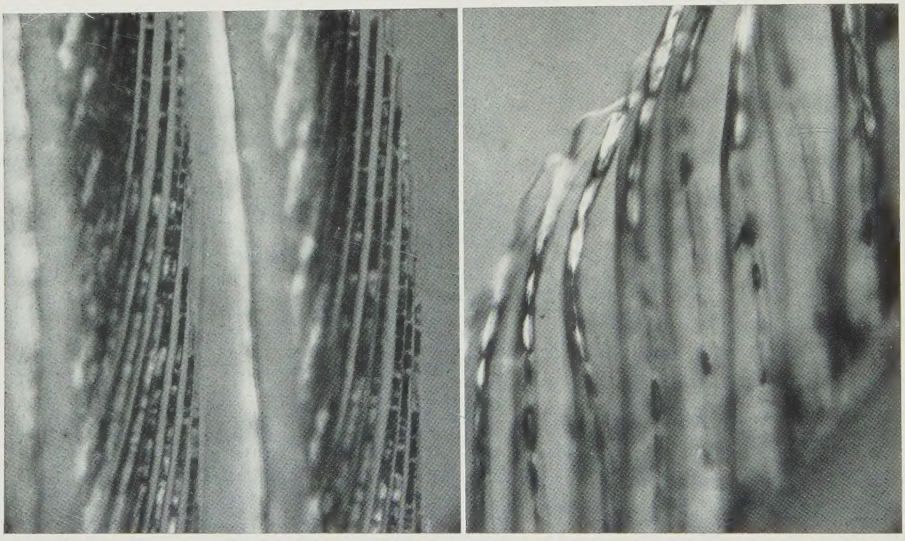
Abb. 3

Abb. 3. *Melopsittacus*, Federast mit beginnender Entpigmentierung durch Pyridin in Canadabalsam, Pol. ×, 380:1: an den Strahlen Hervortreten der Zellgrenzen

Die Untersuchung der Doppelbrechung teilweise entpigmentierter Federn zeigt also, daß der Farbstoff *orientiert* dem Keratin eingelagert ist, derart, daß er dessen positive Doppelbrechung verstärkt; Farbstoff und Keratin besitzen demnach das gleiche, positive Vorzeichen bezogen auf die Länge der Strahlen und Äste; diese aber entspricht dem Verlauf der *Tonofibrillen*, von denen offensichtlich der ordnende Einfluß auf den sich niederschlagenden Farbstoff ausgeübt wird.

Die Orientierung des gelben fluoreszierenden Pigmentes im Keratin äußert sich schließlich auch in dem *Dichroismus*, den es erzeugt: steht die Schwingungs-

richtung des allein eingeschalteten Polarisators parallel der Länge von Strahlen oder Ästen, so sieht man sie bei Melopsittacus deutlich gelb gefärbt; nach Drehen des Objekttisches um 90° aber erscheinen sie blaß gelb, fast farblos; freilich läßt sich diese Beobachtung bequem nur an den stärkst pigmentierten Stellen machen. Bei Cacatua war der Dichroismus von der gleichen Art, nämlich mit der stärkeren Absorption parallel der Länge von Ästen und Strahlen, aber weniger ausgeprägt. Für Platycercus jedoch blieb der Versuch, den Dichroismus zu beobachten, unentschieden.



a b

Abb. 4. a *Melopsittacus*, b *Cacatua*, Federstrahlen mit weiter fortgeschrittener Entpigmentierung durch konzentrierte Schwefelsäure, in Canadabalsam, Pol. ×, drehbare λ/16-Glimmerplatte, 250:1: noch pigmentiertes Keratin stärker doppelbrechend (heller)

IV. Fluoreszenz und Bifluoreszenz der spezifisch pigmentierten Federteile

1. Fluoreszenz im natürlichen Zustande der Feder. Die mit dem spezifischen gelben Pigment versehenen Federteile leuchten im Fluoreszenzmikroskop kräftig auf, wofür Abb. 5 (Cacatua) ein Beispiel gibt. Bei der gewählten schwachen Vergrößerung zeigen die Federstrahlen keine strukturelle Differenzierung. Sind sie aber isoliert und liegen auf ihrer Fläche, dann macht sich Aufgliederung in die Zellen deutlich bemerkbar, indem die *Interzellularen* wie schmale Querbänder dunkel hervortreten (Abb. 6, Melopsittacus). Hier befindet sich also kein Pigment — was übrigens dafür spricht, daß die Tonofibrillen nicht aus einer Zelle in die andere übertreten, sondern ihre Enden an den Zellgrenzen sich miteinander verfugen; dies läßt sich auch durch (noch unveröffentlichte) Mazerationsversuche bei anderen Formen dartun.

Weiter aber geben sich im Federstrahl an geminderter Fluoreszenz (Abb. 6) die Orte der *Zellkerne* zu erkennen, als je ein elliptischer mit der großen Achse nach der Länge des Strahles ausgerichteter Bereich zwischen zwei Interzellularen. Offensichtlich ist die Schichtdicke des fluoreszierenden Farbstoffes durch die Anwesenheit des Kernrestes verringert. Bei mancherlei Vögeln mit anderen Pigmenten, z. B. Melanin, ist die Stelle des Kerns durch verminderte Absorption

schon im gewöhnlichen Licht zu sehen; das spezifische gelbe Papageienpigment aber absorbiert zu schwach, als daß der Kernort in dieser Art hervorträte.

Meist fluoreszieren die Zellen eines Strahles gleichmäßig stark, besitzen also annähernd gleiche Mengen von Farbstoff. Es gibt aber davon eine sehr bemerkenswerte Ausnahme, indem nämlich an der Basis der Äste sich Strahlen finden mit je einer Zelle, die *nicht fluoresziert* oder höchstens sehr schwach, also kein gelbes Pigment oder nur eine sehr geringe Menge davon besitzt (Abb. 7, Platycercus). Diese Zellen liegen dort, wo die Strahlen benachbarter Äste sich durchkreuzen und verklammern, und zwar meist in den beteiligten Hakenstrahlen. Dabei schickt oft die proximal anstoßende Zelle an ihrer vom Ramus abgewandten Seite einen gerade verlaufenden sich zuspitzenden Fortsatz („Haken") aus (s. Abb. 12), der außen an der farbstofffreien Zelle entlang läuft; so kann bei schwächerer Vergrößerung der Eindruck entstehen, die letztgenannte Zelle sei an ihrer Kante pigmentiert.

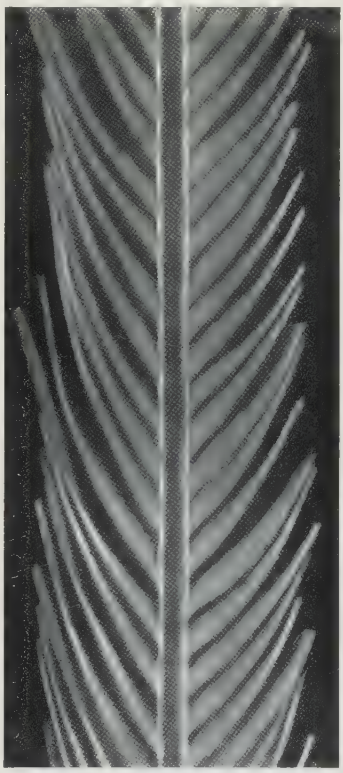


Abb. 5. *Cacatua*, Federast in Canadabalsam. Fluoreszenzbild, 100:1: im Ramus der dunklere Markstrang

Es muß hier bemerkt werden, daß das Auftreten farbstofffreier Zellen zwischen pigmentierten keineswegs nur bei den hier besprochenen Papageienfedern vorkommt, sondern auch bei anderen Vögeln mit anderen Pigmenten (z. B. Melanin, Lipochrom). Alle diese Vorkommnisse lehren, daß bei der Ablagerung des Pigmentes die einzelne Zelle eine Rolle spielt, wie im einzelnen, ist freilich noch nicht bekannt.

Die genannten pigmentfreien Zellen der Papageienfedern, die manchmal auch zu mehreren hintereinander auftreten, lassen sich im gewöhnlichen Durchlicht an dem Mangel der Gelbfärbung nur schwer erkennen. Manchmal aber treten sie auffallend im Polarisationsmikroskop hervor, indem sie verstärktes Aufleuchten, erhöhten Gangunterschied, gegenüber der Umgebung darbieten. Dieser Umstand muß beim Vergleich von Polarisations- mit Fluoreszenzbild beachtet werden, insbesondere bei partiell entpigmentierten Strahlen, in denen für gewöhnlich verstärkte Doppelbrechung noch erhaltenes Pigment anzeigt (s. S. 475), während es sich jetzt um pigment*freie* Zellen mit verstärkter Doppelbrechung handelt[1].

[1] Es sei hier erwähnt, daß nach meiner Beobachtung die carotinoidführenden roten Federn des *Cymborhynchus macrorhynchus* in dem gleichen Federstrahl einzelne *farblose* Zellen aufweisen, die sich auch durch *verstärkte Doppelbrechung* auszeichnen, so daß man schon bei schwacher Vergrößerung im Polarisationsmikroskop die pigmentfreien Zellen sieht. Sie halten sich im Durchkreuzungsgebiet der Strahlen benachbarter Äste und zeichnen sich durch *besondere Form* aus, indem sie senkrecht zur allgemeinen Abflachungsebene des Strahles zusammengedrückt und damit in der Durchblickrichtung dicker sind als ihre Nachbarn, was den erhöhten Gangunterschied erzeugt. Auch bei den mit spezifischem gelben Pigment gefärbten Papageienfedern zeigt sich ähnliches an den farblosen Zellen, wenn auch nicht so ausgeprägt.

Auch bei den rötlichbraun fluoreszierenden Strahlen (s.u.) im Übergangsgebiet zum flaumigen Federteil ist der Pigmentgehalt aufeinanderfolgender Zellen des gleichen Strahles oft auffallend verschieden; ihr abwechselnd stärkeres oder schwächeres Aufleuchten im Fluoreszenzmikroskop läßt die Gliederung des Strahles in seine Zellen sogleich hervortreten.

Gelegentlich trifft man in Strahlen mit gelbem fluoreszierenden Pigment auch Zellen, die *Melanin*körnchen enthalten. Sind es nur wenige, so bleiben sie auf die Fluoreszenz ohne merklichen Einfluß; mit ihrer wachsenden Anhäufung aber wird die Fluoreszenz immer schwächer, um schließlich zu verschwinden. So scheint es, als ob Melanin und spezifisches gelbes Pigment bis zu einem gewissen Grade sich gegenseitig ausschließen.

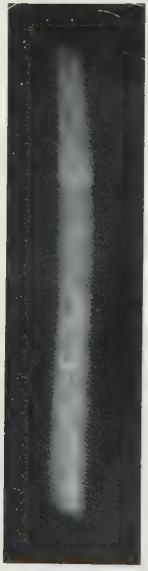


Abb. 6

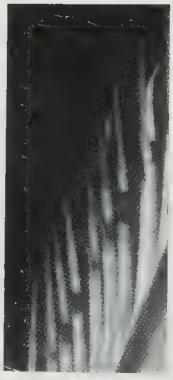


Abb. 7

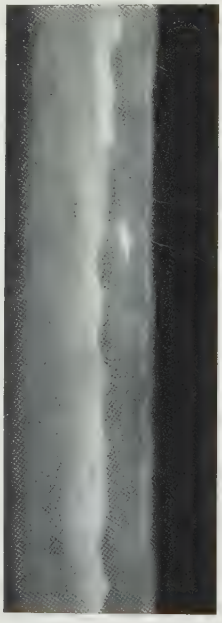


Abb. 8

Abb. 6. *Melopsittacus*, Federstrahl in Canadabalsam, Fluoreszenzbild, 250:1: Zellgrenzen und Kernorte sichtbar

Abb. 7. *Platycercus*, Stück eines Federastes in Canadabalsam, Fluoreszenzbild, 200:1: in jedem Federstrahl eine unpigmentierte Zelle

Abb. 8. *Melopsittacus*, Federast auf der Seite liegend, Fluoreszenzbild, 250:1: rechts am Ramus der dunkle Markstrang

Die *Federäste* leuchten an ihrem Rande im Fluoreszenzmikroskop gleichmäßig auf, ohne daß einzelne Rindenzellen sich unterscheiden ließen (Abbildung 5).

Mitten durch den Ast aber zieht der im Fluoreszenzbild dunklere *Markstrang*. Abb. 8 zeigt ihn an einem auf der Seite liegenden Ramus und läßt die einzelnen Markzellen erkennen, nach links hin bogig gegen die Rinde vorspringend. In der Mitte des Bildes findet sich eine Lücke zwischen den Markzellen und hier sieht man die Rinde von der Unterseite her durchleuchten. Demnach könnte das schwache Aufleuchten des Markstranges zum Teil durch seine Lichtundurchlässigkeit bedingt sein. Isoliert man Markzellen, wie es beim Abschaben der Radien vom Ramus mittels eines feinen Skalpells gelegentlich gelingt, so gewahrt man, freilich sehr schwache, weißliche Fluoreszenz an ihrem Keratin.

Die *Fluoreszenzfarbe* ist bei Melopsittacus schwefelgelb, insbesondere an den Federästen. Die Strahlen aber liefern basalwärts am Ramus orangefarbene bis braunrötliche Fluoreszenz. Manchmal sieht man auf der einen Seite eines Astes die Radii schwefelgelb fluoreszieren, auf der anderen orangefarben. Bei Cacatua fand ich die Fluoreszenz von Ästen und Strahlen goldgelb bis orangegelb.

Während so die Fluoreszenzerscheinungen von Melopsittacus und Cacatua ähneln, unterscheidet sich Platycercus von beiden durch das grünlichgelbe Licht, das seine Federn im Fluoreszenzmikroskop entsenden.

2. Fluoreszenz der partiell entpigmentierten Feder. Die Untersuchung der *Fluoreszenz* von Federteilen, die zum Teil des spezifischen gelben Pigmentes beraubt sind, hat sich nicht minder bewährt als bei der Analyse der Polarisationsoptik. Die mit beiden Verfahren gewonnenen Einsichten ergänzen sich.

Bei Melopsittacus, Cacatua und Platycercus wurden die Lösungsversuche mit Kalilauge und mit Schwefelsäure angestellt, nur mit Pyridin aber bei der erstgenannten Form.

Die Erscheinungen bei der Verwendung von Kalilauge und Schwefelsäure stimmen bei den 3 Papageien im wesentlichen überein, so daß zusammenfassend darüber berichtet werden kann.

10%ige Kalilauge zerstört die gelbe Fluoreszenz der Federstrahlen von Melopsittacus, Cacatua und Platycercus rasch. Man sieht unter dem Fluoreszenzmikroskop das leuchtende Material „wegschmelzen" und zugleich verlöschen. Die Lösung geht oft von den Interzellularen aus, so daß die aufeinanderfolgenden Zellen sich mehr und mehr voneinander absetzen. Mit dem Verschwinden der gelben Fluoreszenz kommt an den pigmentfrei gewordenen Stellen die *bläuliche* des *Keratins* zum Vorschein, so daß ein sehr farbenprächtiges Bild entsteht, an dem auch wohl der Simultankontrast der beiden annähernd komplementären Farben beteiligt ist. Nach längerer Einwirkung der Kalilauge nimmt die Keratinfluoreszenz ab.

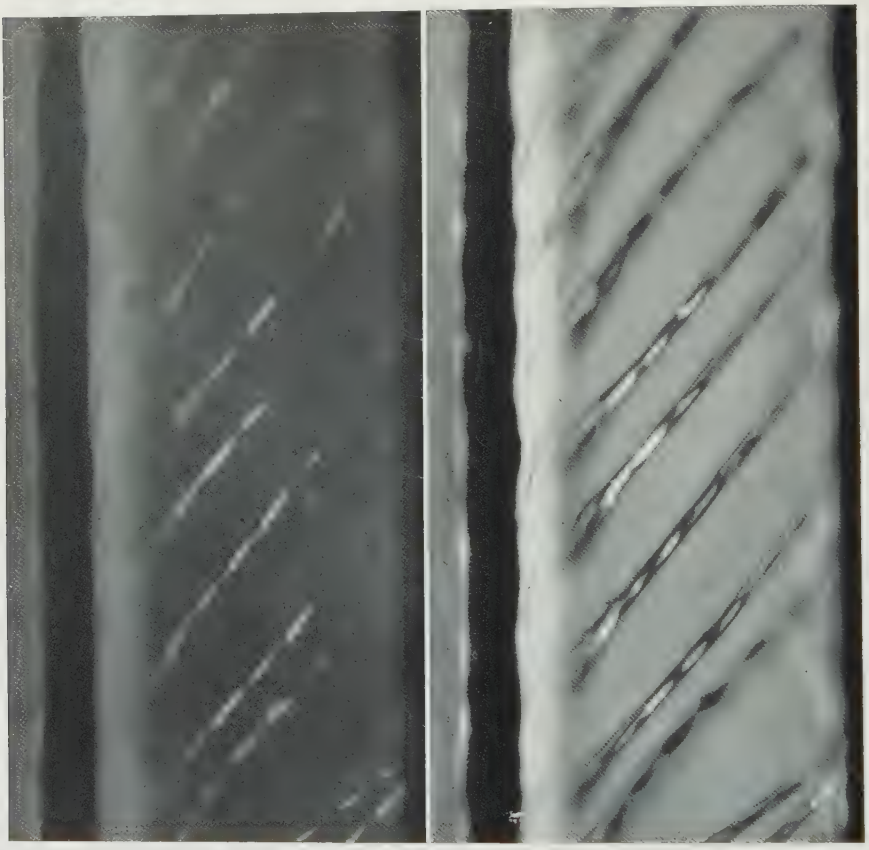
Bei Anwendung *schwacher Kalilauge* geht das Leuchten der pigmenthaltigen Federteile allmählich von goldgelb auf schwachgelb zurück, es erscheint aber nicht die blaue Fluoreszenz des Keratins. Zugeben von verdünnter Salzsäure läßt die alte Fluoreszenz wiederkehren. Diese Vorgänge (s. S. 470), die sich beliebig oft wiederholen lassen, liefern keine Differenzierung an den einzelnen Zellen, da das Pigment nicht zur Lösung kommt.

Konzentrierte Schwefelsäure löst den Farbstoff langsamer als Kalilauge, aber immer schon in einigen Minuten. Die Fluoreszenz des gelben Pigmentes beginnt oft an den Interzellularen der Strahlen zu verschwinden. Das in den einzelnen Zellen hinterbliebene Pigment nimmt bei der fortschreitenden Lösung nicht selten *längsstreifige Struktur* an. Damit kommt der *Einfluß der längsverlaufenden Tonofibrillen* auf die Ordnung des Pigmentes zutage — wie er auch für manche nichtfluoreszierende Pigmente an morphologischen und insbesondere polarisationsoptischen Anzeichen zu erkennen ist.

Mit *verdünnter Schwefelsäure* (Beigabe konzentrierter Säure zu dem im Wasser unter Deckglas befindlichen Objekt) verläuft der Lösungsvorgang langsamer und weniger charakteristisch und es scheint, als ob die Zellen mehr von ihren lateralen Kanten her angegriffen würden.

Abb. 9a gibt das *Fluoreszenzbild* eines mit konzentrierter Schwefelsäure partiell entpigmentierten und dann zum Dauerpräparat verarbeiteten Federastes von *Platycercus*. Am Ramus selbst ist eine Differenzierung hinsichtlich des gelben Pigmentes nicht eingetreten; er leuchtet nur schwächer auf als im normalen Zustande. Die Federstrahlen aber künden lokalen Verlust des Pigmentes an,

indem in jedem Radius nur ein schmaler mittlerer Streifen von etwas unregelmäßigem Verlauf gelb fluoresziert. Die einzelne Zelle zeigt eine Anschwellung des verbliebenen Pigmentes, die sich nach den Zellgrenzen hin verdünnt, schließlich so weit, daß benachbarte Zellen durch ein kürzeres oder längeres nicht fluoreszierendes Gebiet getrennt sind. Abb. 9b stellt das *Polarisationsbild* des



a b

Abb. 9a u. b. *Platycercus*, Stück eines Federastes, mit konzentrierter Schwefelsäure partiell entpigmentiert: a Fluoreszenzbild, b Polarisationsbild, das letzte mit drehbarer $\lambda/16$-Glimmerplatte, 250:1

gleichen Objektes dar, das hinsichtlich der Pigmentreste die Übereinstimmung mit dem Fluoreszenzbild erkennen läßt. Die Einzelheiten im Polarisationsbild verhalten sich so, wie es bereits oben (s. S. 475) für Melopsittacus und Cacatua des näheren erläutert wurde, d. h. die Anwesenheit des Pigmentes verrät sich durch stärkere Doppelbrechung (erhellte Stellen).

An *Pyridin*präparaten (Abb. 10a, Melopsittacus) macht sich ebenfalls die Lösung des fluoreszierenden Pigmentes zuerst an den *Strahlenzellen* bemerkbar, so daß die einzelnen sich deutlich voneinander absetzen. Entsprechendes geschieht aber auch an den *Rindenzellen* der Äste (Abb. 10b): Während diese im natürlichen Zustande des Objektes nicht einzeln hervortreten (s. Abb. 5), heben sie sich jetzt deutlich voneinander ab; die Lösung des Pigmentes setzt im ganzen Umkreis der spindeligen Zellen ein, so daß sie dunkel umrahmt erscheinen.

Bei stärkerem Herauslösen des Pigmentes mit Pyridin zeigen die verbliebenen Reste des Farbstoffes die längsstreifige Struktur, wie sie schon bei der Einwirkung von Schwefelsäure und Kalilauge beschrieben wurde, die, wie dort, anzeigt, daß der fluoreszierende Farbstoff nach den Tonofibrillen geordnet ist.

Ebenfalls durch *Chlor*-(Chloratren-)*behandlung* läßt sich das gelbe Pigment zerstören. Auch bei diesem Verfahren setzt das Verschwinden des Farbstoffes an den Interzellularen der Strahlen ein, erfaßt ihn dann aber in seiner ganzen Ausdehnung; die Fluoreszenz wird schwächer und verschwindet schließlich — ohne daß bezeichnende Lösungsbilder zustande kämen. Bisweilen hat man den Eindruck, als ob die Pigmentmasse, im Fluoreszenzmikroskop aufglitzernd, eine Art Körnung erkennen lasse.

3. Bifluoreszenz der Feder. Prüfung der spezifischen Fluoreszenz von Federstrahlen und -ästen mit einem *Polar* (s. S. 471) läßt einwandfrei Bifluoreszenz erkennen. Das überrascht nicht, nachdem Doppelbrechung und Dichroismus die orientierte Einlagerung des Farbstoffes erwiesen haben (s. S. 475), der freilich zur Erzeugung von Bifluoreszenz diese letzte selbst besitzen muß.

a Abb. 10 b

Abb. 10 a u. b. *Melopsittacus*, Fluoreszenzbild: Zellgrenzen a in den Federstrahlen, b in der Rinde eines Federastes, durch partielle Lösung des spezifischen gelben Pigmentes mit Pyridin sichtbar gemacht, 250:1

Abb. 11

Abb. 11. *Melopsittacus*, Federstrahl in Canadabalsam, Fluoreszenzbild mit Dichroskopokular aufgenommen, 200:1: Bifluoreszenz, in der unteren Bildhälfte Schwingungsrichtung des Fluoreszenzlichtes ↕, in der oberen ↔

Nicht immer bieten die am stärksten im Fluoreszenzmikroskop aufleuchtenden Federteile die kräftigste Bifluoreszenz dar; manchmal zeigt sie sich bei geringer Anhäufung von Pigment deutlicher. Solches Verhalten beruht darauf, daß Keratingebilde keine Idealstruktur besitzen, vergleichbar etwa dem Atomgitter eines Kristalls; vielmehr ist der Verlauf der Tonofibrillen und auch wohl der sie aufbauenden Mikrofibrillen nicht streng parallel, sondern „streut", in der gleichen Ebene des Objektes und in den übereinandergelegenen, was den theoretisch möglichen Maximaleffekt der Bifluoreszenz herabsetzt. Die Streuung wächst mit der Schichtdicke, indem immer neue Lagemannigfaltigkeiten des fluoreszierenden Pigmentes auftreten. So wird auch verständlich, warum Federteile nach partieller Entpigmentierung die Bifluoreszenz bisweilen besser zeigen als zuvor.

Bei der mit spezifischem Pigment gefärbten Federteilen unterscheiden sich die beiden linear polarisierten Lichtanteile, die das Objekt entsendet, nach Intensität und Farbe.

Hinsichtlich der *Intensität* ist stets das *längs* zu den Strahlen und Ästen und damit längs der Tonofibrillen schwingende Licht bevorzugt, bisweilen in solchem Maße, daß das querschwingende Licht nur eben noch bemerkbar bleibt.

Abb. 11 führt den Helligkeitsunterschied an einem *Federstrahl* von Melopsittacus im *Dichroskopokular* vor: im unteren Teil des Photogramms schwingt

das Fluoreszenzlicht längs zum Radius, im oberen quer. Die Grenze der Sehfeldhälften im Okular läuft (annähernd in der Mitte des Bildes) schräg über den Strahl hinweg; an dieser Stelle ist die Intensität der Fluoreszenz in den beiden Objektabschnitten am besten vergleichbar. Das quer zum Strahl schwingende Licht läßt die Zellgrenzen besser hervortreten, während sie bei dem starken Aufleuchten des Objektes im längsschwingenden Licht untergehen.

a b

Abb. 12. *Platycercus*, Federstrahlen in Canadabalsam, Fluoreszenzbild, 200:1: Bifluoreszenz, a Schwingungsrichtung des Fluoreszenzlichtes ↕, b ↔

Nebeneinander erscheint das Fluoreszenzverhalten für die beiden Normallagen der *Federstrahlen* von Platycercus in Abbildung 12. Auch hier zeigt sich die größere Intensität des längsschwingenden Lichtes (a), während das querschwingende (b) fast verlöscht. Die dargestellten Radii besitzen jeweils eine unpigmentierte und daher nicht fluoreszierende Zelle; sie wird größtenteils von dem Fortsatz der proximal anschließenden Zelle verdeckt.

Die gleichen Bifluoreszenzerscheinungen wie an den Strahlen lassen sich an den *Rindenzellen* der Rami beobachten, besonders gut, wenn deren Radii mit einem feinen Skalpell abgeschabt wurden. Dann leuchtet die Rinde im Randgebie des Astes kräftig auf, wenn er längs der Schwingungsrichtung des Polars orientiert ist, viel weniger aber, wenn er quer dazu liegt. Am Rande des Astes wirken die Rindenzellen mit größter Schichtdicke; in seinem mittleren Teil ist diese nicht nur geringer, sondern auch der luftgefüllte Markstrang mindert die Fluoreszenz.

Die beiden linear polarisierten Anteile des Fluoreszenzlichtes, das Strahlen- und Rindenzellen entsenden, unterscheiden sich bei allen untersuchten Formen auch durch die *Farbe*. So ist bei Cacatua die Bifluoreszenz Gelb/Rötlichgelb, wobei die vorangehende Angabe sich auf das längs zum Strahl bzw. zum Ast schwingende Licht bezieht. Stehen die Strahlen auf den beiden Seiten eines Astes annähernd senkrecht zueinander und bringt man sie durch Drehen des Objekttisches etwa links parallel, und rechts senkrecht zur Schwingungsrichtung des Analysators, so erscheinen die Strahlen der beiden Längshälften des Astes in verschiedener Fluoreszenzfarbe. Nach Behandeln mit konzentrierter Schwefelsäure zeigte sich die Fluoreszenz gelblichrot-orange, wobei an dem betreffenden Präparat die Reste des Pigmentes in der Rinde langgestreckt und fadenförmig erschienen.

Bei Platycercus bot sich an den Strahlen und Rindenzellen die Bifluoreszenz Grünlichgelb/Gelb dar, an schwefelsäurebehandelten Präparaten Gelblich/Schwach-Gelblich mit rötlichem Stich[1].

[1] Bei Platycercus sah ich an Federästen den seitlichen Teil des Markstranges braunrötlich im Fluoreszenzmikroskop erhellt, und zwar nur, wenn die Markzellen Luft enthielten; mit

Federteile von Melopsittacus zeigten die Bifluoreszenz Gelblich/Orangegelb. An jenen, schon schmal gewordenen Strahlen, die den Übergang zum Federflaum bilden, erschien bräunlichrötliche Fluoreszenz, oft mit merklichen Unterschieden der Stärke bei benachbarten Zellen; ließen doch einige von diesen die blaue Keratinfluoreszenz erkennen.

Gemäß dem Vorstehenden ist das *ohne* Analysator beobachtete Fluoreszenzlicht das Gemisch der beiden linear polarisierten nach Intensität und Farbe verschiedenen Anteile.

Anhang: Sekundärfluoreszenz und -bifluoreszenz bei Federn

Angesichts der untersuchten natürlichen Fluoreszenz und Bifluoreszenz lag es nahe, Federn mit *Fluorochromen* zu behandeln und zu erproben, ob sekundäre Fluoreszenz und sekundäre Bifluoreszenz sich einstellen. Dabei ist es für das Auftreten der letzten zu beachten, daß das Objekt nicht nur das betreffende Fluorochrom ausreichend speichern, sondern auch orientiert einlagern muß.

Zu den Versuchen dienten zunächst *unpigmentierte* Federteile, und zwar der *flaumige Anteil* gelber nicht fluoreszierender Melopsittacusfedern, deren Radien im Durchlicht farblos, im Auflicht weiß erschienen. Die Federstrahlen bestehen aus sehr gestreckten Zellen, die an den Interzellularen kelchartig verdickt sind, indem die jeweils proximale Zelle mit ihrem pinselartig aufgespalteten distalen Ende die Basis der nächsten Zelle umfaßt.

Als Fluorochrome dienten *Primulin* und *Trypaflavin*, in deren wäßrige Lösung die genannten Federchen für 12—24 Std kamen; dann wurden sie, kurz in Wasser abgespült, einem Objektträger mit Fließpapier angedrückt. Wenn nach einiger Zeit die einzelnen Strahlen sich voneinander gelöst und gespreizt hatten, also das Objekt vollkommen trocken war, wurden Stückchen des ungefärbten flaumigen Teiles zu einem möglichst dünnen Canadabalsampräparat verarbeitet.

Während nun der Flaum in seinem natürlichen Zustande im Strahlengang des gefilterten Lichtes der Quecksilberlampe sich kaum erhellt und unter dem Fluoreszenzmikroskop eben noch die Strahlen graublau erkennen läßt, leuchtet der mit Primulin behandelte Flaum bei Betrachtung mit unbewaffnetem Auge im UV-Licht kräftig himmelblau auf und das Mikroskop zeigt jeden Strahl in größter Schärfe, hellbläulich, die knotigen Verdickungen an den Interzellularen aber mehr weißlich. Wo sich in distalem Teil der Zelle nahe dem Knoten Melanin befand, erschien es wie ein dunkler nicht fluoreszierender Punkt.

Trotz dieser kräftigen Fluoreszenz war die *Bifluoreszenz* äußerst schwach, nur im mittleren Teil der Zelle daran kenntlich, daß das längs zum Federstrahl schwingende Licht das Objekt heller zeigte als nach Drehung des Analysators um 90°.

Durch *gelbes*, nichtfluoreszierendes *Pigment gefärbte Federteile* von Melopsittacus boten nach Behandlung mit Primulin die Äste und Strahlen des nichtflaumigen Federabschnittes in *grünlicher* Fluoreszenz dar, weil das von ihnen ausgesandte bläuliche Fluoreszenzlicht die gelbe Hornmasse wie ein Filter passieren muß.

deren Verdrängung verschwand das braunrötliche Aufleuchten. Offensichtlich handelt es sich hier um die Wirkung des trüben Mediums (s. S. 473) im Durchlicht, das die Fluoreszenzfarbe wie ein Filter verändert.

Federteile mit *fluoreszierendem Pigment* erhielten durch Primulinbehandlung an Stelle der gelben Eigenfluoreszenz *bläulich-violetten* Ton, weil zur primären Fluoreszenz noch die sekundäre des Fluorochroms hinzukommt. Prüft man mit dem Analysator auf Bifluoreszenz, so tritt die blaue Komponente der Primulinwirkung stärker hervor, wenn das Licht quer zum Federstrahl oder -ast schwingt; jetzt ist nämlich die Eigenfluoreszenz mehr geschwächt, als die vom Fluorochrom verursachte; d. h. dessen Bifluoreszenz ist schwach.

Zusammenfassung

Die mit *gelbem fluoreszierendem Pigment* versehenen Federteile der Papageien *Melopsittacus*, *Cacatua*, *Platycercus* wurden vergleichend im gewöhnlichen, im Polarisations- und im Fluoreszenzmikroskop untersucht:

1. Weder im gewöhnlichen Licht noch zwischen gekreuzten Polars verrät sich dieses Pigment durch strukturelle Differenzierung; es erscheint dilut. Mit *Schwefelsäure*, *Kalilauge*, *Pyridin partiell entpigmentierte Federn* lehren, daß der eingelagerte *Farbstoff* die *Lichtbrechung* und die zum Tonofibrillenverlauf (= längs der Federstrahlen und -äste) positive *Doppelbrechung des Keratins verstärkt*. Weiter erzeugt das Pigment *Dichroismus* mit stärkerer Absorption parallel den Tonofibrillen. Der fluoreszierende Farbstoff ist also *orientiert* eingelagert.

2. Die vom Pigment hervorgerufene *Fluoreszenz* zeigt sich sowohl an den *Strahlen* wie an der *Rinde* der Äste; an den *Markzellen* ließ sich spezifische Fluoreszenz nicht wahrnehmen. Strukturelle Differenzierung des Pigmentes ist auch am Fluoreszenzbild nicht erkennbar; jedoch weisen die bei der Entpigmentierung auftretenden *streifigen Lösungsbilder* auf die optisch nachgewiesene (s. unter 1.) Orientierung des Pigmentes nach den Tonofibrillen hin. Die Orte der Zellkerne zeigen sich in den Strahlen als Bereiche mit geminderter Fluoreszenz. Es finden sich vereinzelte Strahlenzellen, die nicht (oder nur ganz unwesentlich) fluoreszieren, insbesondere da, wo die Radii benachbarter Äste sich durchkreuzen und verklammern. Geringe Mengen von Melanin können in den fluoreszierenden Strahlenzellen auftreten; stärkerer Melaningehalt aber scheint die Ablagerung des spezifischen gelben Pigmentes auszuschließen.

3. Die Zellen der Federstrahlen und der Rinde der Äste zeigen, mit einem Analysator geprüft, ausgeprägte *Bifluoreszenz*: Stets ist die Schwingungsrichtung positiven Vorzeichens der Doppelbrechung und stärkerer Absorption — also das *längs zu Strahlen und Ästen schwingende Fluoreszenzlicht — nach der Intensität bevorzugt*; das kann soweit gehen, daß das querschwingende Fluoreszenzlicht nur eben noch erregt wird. Weiter aber ist die Bifluoreszenz nach der *Wellenlänge* differenziert, derart, daß im querschwingenden Licht die Farbe rötlich nuanciert erscheint. An den vom Pigment befreiten Stellen zeigt sich die vorher verdeckte bläuliche Fluoreszenz des Keratins.

4. Es wurde, vor allem mit *Primulin*lösung, versucht, verschiedenen Federteilen von Melopsittacus *Sekundärfluoreszenz* zu erteilen bzw. solche bereits vorhandener Primärfluoreszenz zu überlagern. Pigmentfreier weißer Flaum von Melopsittacus leuchtet jetzt kräftig himmelblau im Fluoreszenzmikroskop auf und läßt die feinsten Einzelheiten der fädig gestreckten Strahlenzellen erkennen, die in ihrem mittleren Abschnitt — freilich sehr schwache — Bifluoreszenz darbieten. Mit nichtfluoreszierendem gelben Farbstoff versehene Federteile leuchten im

Fluoreszenzmikroskop grünlich, weil das bläuliche Fluoreszenzlicht des Primulins wie durch ein gelbes Filter gesehen wird. Federteile mit gelbem fluoreszierenden Pigment strahlen nach der Färbung bläulichviolettes Licht aus, im Zusammenwirken von Eigen- und Sekundärfluoreszenz.

Literatur

Gottschewsky, G. H. M.: Apparate und Einrichtungen für qualitative fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen. In Handbuch der Histochemie, Bd. I, 1, S. 160—170. Stuttgart 1958.

Haitinger, M.: Fluoreszenz-Mikroskopie, II. Aufl. Leipzig 1959.

Lerma, B. de: Die Anwendung von Fluoreszenzlicht in der Histochemie. In Handbuch der Histochemie, Bd. I, 1, S. 78—159. Stuttgart 1958.

Scharf, J.-H.: Fluoreszenz und Fluoreszenzpolarisation der Nervenfaser nach Färbung mit Phenyloxyfluoronen. Versuch einer Interpretation. Mikrochemie (Wien) **11**, Teil I, 261—319; Teil II, 349—397 (1956).

— Bathochromie und Hyposochromie als Grundlagen fluoreszenz-chromotroper Effekte. Acta histochem. (Jena) Suppl. **1**, 140—148 (1958).

Völker, O.: Über den gelben Federfarbstoff des Wellensittichs [Melopsittacus undulatus (Shaw)]. J. Ornithol. **84**, 618—630 (1936).

— Über fluoreszierende gelbe Federpigmente bei Papageien, eine neue Klasse von Federfarbstoffen. J. Ornithol. **85**, 136—146 (1937).

— Zur Frage der Verteilung der gelben Feder-Fluoreszenz. Ornithol. Mb. **48**, 182—185 (1940).

— Die Farbstoffe im Gefieder der Vögel. Fortschr. Chem. org. Naturstoffe **18**, 177—185 (1960).

Ziegenspeck, H.: Emission polarisierten Fluoreszenzlichtes (Difluoreszenz) durch gefärbte Zellulose- und Kutinmembranen von Pflanzen. Mikroskopie (Wien) 1. Sonderband, 71—85 (1949).

Professor Dr. Dr. h. c. W. J. Schmidt,
Gießen, Zoologisches Institut, Ludwigstraße 23

Zeitschrift für Zellforschung 55, 486—499 (1961)

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg
(Direktor: Prof. Dr. H.-W. Altmann)

ZUR FEINSTRUKTUR DER MACULA DENSA IM NEPHRON DER MAUS

Von

Wolfgang Thoenes

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. Juni 1961)

Der dicke, aufsteigende Schenkel der Henleschen Schleife tritt, ehe er in das distale Tubuluskonvolut übergeht, in engen Kontakt mit dem Gefäßpol des Glomerulum. Der dem Glomerulum direkt anliegende, umschriebene Wandabschnitt des Schleifenschenkels wird nach K. W. Zimmermann (1933) als „Macula densa" bezeichnet. Er ist lichtmikroskopisch gegenüber anderen Tubulusabschnitten u.a. durch eine auffallend dichte Lagerung von Zellkernen gekennzeichnet.

Die Macula densa ist ein Teil des sog. juxtaglomerulären Apparates. Zu diesem Apparat gehören außerdem bestimmte Zellgruppen, einmal die von H. Becher (1943) so benannten „paraportalen" oder „paravaskulären" Zellen, auf die wir in unserer Arbeit mangels entsprechender elektronenmikroskopischer Beobachtungen nicht eingehen, zum anderen eine größere Gruppe von Zellen, deren Nomenklatur sehr unterschiedlich gehandhabt wird. Wir bezeichnen sie hier in ihrer Gesamtheit als „juxtaglomeruläre Zellen" bzw. als den „juxtaglomerulären Zellhaufen". Der letztere Begriff wäre mit dem des „Polkissens" von K. W. Zimmermann (1933) identisch. Innerhalb des juxtaglomerulären Zellhaufens unterscheiden wir 2 Zelltypen: *Granulierte Zellen* (= „epitheloide" Zellen von Ruyter 1925, „Quellzellen" von H. Becher 1936), die in der Wand des Vas afferens liegen, und *ungranulierte Zellen* (= „corpuscle nerveux-sensitif" von Goormaghtigh 1932), die überwiegend im Bereich des Glomerulumstieles zwischen Macula densa und den Hilusgefäßen angeordnet sind[1].

Der Terminus: juxtaglomerulärer „Apparat" soll besagen, daß die daran beteiligten Elemente funktionell miteinander verknüpft sind (vgl. Goormaghtigh 1951, H. Becher 1949, Oberling und Hatt 1960). Da die Macula densa eine wichtige Stellung in dem hypothetischen Funktionsablauf dieses Apparates einnimmt, ist eine genauere Kenntnis der Feinstruktur des Macula-Epithels und seiner Verbindung mit den juxtaglomerulären Zellen und dem Glomerulum selbst von Interesse.

Da elektronenmikroskopische Beobachtungen zu diesem Thema bisher nur von Oberling und Hatt (1960), allerdings ohne genauere Bildbelege, vorgelegt worden sind, haben wir entsprechende Untersuchungen durchgeführt. Ein Teil

[1] Von manchen Autoren wird nur die zuletzt genannte Gruppe der *un*granulierten Zellen als „Polkissen" im Sinne K. W. Zimmermanns (1933) bezeichnet. Unseres Erachtens besteht diese Beschränkung des Begriffes zu Unrecht, da Zimmermann immer wieder betont, daß ein Teil der Polkissenzellen in der Wand des Vas afferens liege (s. z. B. die Legenden zu seinen Abb. 1—5). Daß er in diesen, von ihm als besonders hell bezeichneten Zellen keine Granula nachweisen konnte, hatte offenbar technische Gründe (Färbung). Andererseits ist es auch nicht angängig, unter dem „Polkissen" nur die Gruppe der in der Gefäßwand liegenden granulierten Zellen zu verstehen, da Zimmermann (s. seine Abb. 6 u. 9) auch die ungranulierten Zellen im Bereich des Glomerulumstieles zum Polkissen rechnete. Für die Zusammenfassung der beiden Zellgruppen scheinen auch neuere Untersuchungen von D. B. Kroon (1960) zu sprechen.

unserer deskriptiven Ergebnisse ist freilich durch die soeben, während der Vorbereitung unseres Manuskriptes veröffentlichten, demselben Problem gewidmeten, ersten Beobachtungen von Bucher und Reale (1961) vorweggenommen worden. Wir teilen unsere Befunde dennoch mit, weil sie einmal eine erwünschte Bestätigung dieser Beobachtungen darstellen, zum anderen in manchen Punkten darüber hinausführen und gewisse, bisher nicht erörterte physiologische Folgerungen ermöglichen.

Untersuchungsgut und Methodik

Zwei Nieren von etwa 15 g schweren, weißen Mäusen wurden in kurzem Ätherrausch lebensfrisch entnommen. Sofortige Fixierung von etwa 1 mm³ großen Stückchen der Nierenrinde in 1%iger, gepufferter, isotonischer OsO_4-Lösung. Entwässerung in aufsteigender Azeton-Reihe. Einbettung in Vestopal W [mit 1% Initiator und 0,5% Aktivator, Polymerisation 18 Std bei 60° C nach Kellenberger, Schwab und Ryter 1956)]. Anfertigung der Dünnschnitte mit dem SERVALL-Mikrotom nach Porter und Blum (Glasmesser), der elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit dem SIEMENS-Elmiskop I bei 60 oder 80 kV.

Durch wechselweise Herstellung von Schnitten verschiedener Dicke vom gleichen, in Vestopal eingebetteten Gewebsstückchen wurden licht- und elektronenmikroskopische Vergleichsbilder gewonnen. Die zur lichtmikroskopischen Untersuchung dienenden, 1—2 μ dicken Schnitte wurden auf Glasobjektträger übertragen und ohne Herauslösen des Einbettungsmittels mit konzentrierter Giemsa-Lösung gefärbt (Thoenes 1960). Die lichtmikroskopischen Bilder in Abb. 1 wurden von solchen Schnitten gewonnen.

Befunde

Die hier vorgelegten elektronenmikroskopischen Bilder stammen von insgesamt 7 Glomerula der Mäuseniere; 4 davon sind in Abb. 1 lichtmikroskopisch wiedergegeben. Man erkennt deutlich die Macula densa (*Md*) in Längs-, Quer- oder Schrägschnitt mit ihren dicht bei dicht liegenden Epithelzellkernen, außerdem die beiden Komponenten des juxtaglomerulären Zellhaufens (Polkissens), die granulierten (*GR* in Abb. 1 d) und die ungranulierten (*UGR* in Abb. 1 a) Zellen.

Das elektronenmikroskopische Übersichtsbild in Abb. 2 (parallel zur lichtmikroskopischen Abb. 1 a) zeigt einen Querschnitt durch den distalen Tubulus in Höhe der Macula densa. Man erkennt bereits bei dieser Vergrößerung Unterschiede in der Feinstruktur des Epithels je nachdem, ob es der (glomerulumzugewandten) Macula densa oder dem gegenüberliegenden (glomerulum-abgewandten) Wandabschnitt angehört.

Bei stärkerer Vergrößerung erkennt man, daß das *glomerulum-abgewandte Epithel* (Abb. 3, rechte Bildhälfte) alle Charakteristika des distalen Tubulusepithels mit seinem ausgeprägten, polaren Bauplan trägt: Der apikale Zellteil, der nur kleine Vakuolen (*V*) und wenige Mitochondrien (*Mi*) enthält, ragt mit einer leicht zerklüfteten oder einzelne Mikrovilli tragenden Oberfläche unterschiedlich weit in das Lumen (*L*) vor. Der basale Zellteil zeigt dagen die bekannten, tiefen Einfaltungen der basalen Zellmembran, durch die die Zellen in zahlreiche, von großen, langgestreckten Mitochondrien erfüllte Zytoplasmafächer aufgeteilt sind. Im Zytoplasma finden sich massenhaft RNP-Partikel (*P*), weshalb die Zellen verhältnismäßig dicht erscheinen. Profile des endoplasmatischen Retikulum (*ER*) sind dagegen selten. Selbstverständlich sind auch die übrigen Strukturelemente des Zytoplasmas (Golgi-Zone, Zentriol usw.) nachzuweisen. Die Zellkerne (*N*), die häufig randständige Nukleolen zeigen, liegen wie in dem dicken aufsteigenden

Schleifenschenkel häufig an der Zellbasis. Zwischen den Zellen finden sich Schlußleisten (*SL*). Basal davon sind die Epithelien tief miteinander verzahnt; oberhalb, also lumenwärts von der Schlußleiste, greifen sie mit nur kurzen Zytoplasmafortsätzen ineinander. Die lumennahe Verzahnung ist offenbar sehr locker,

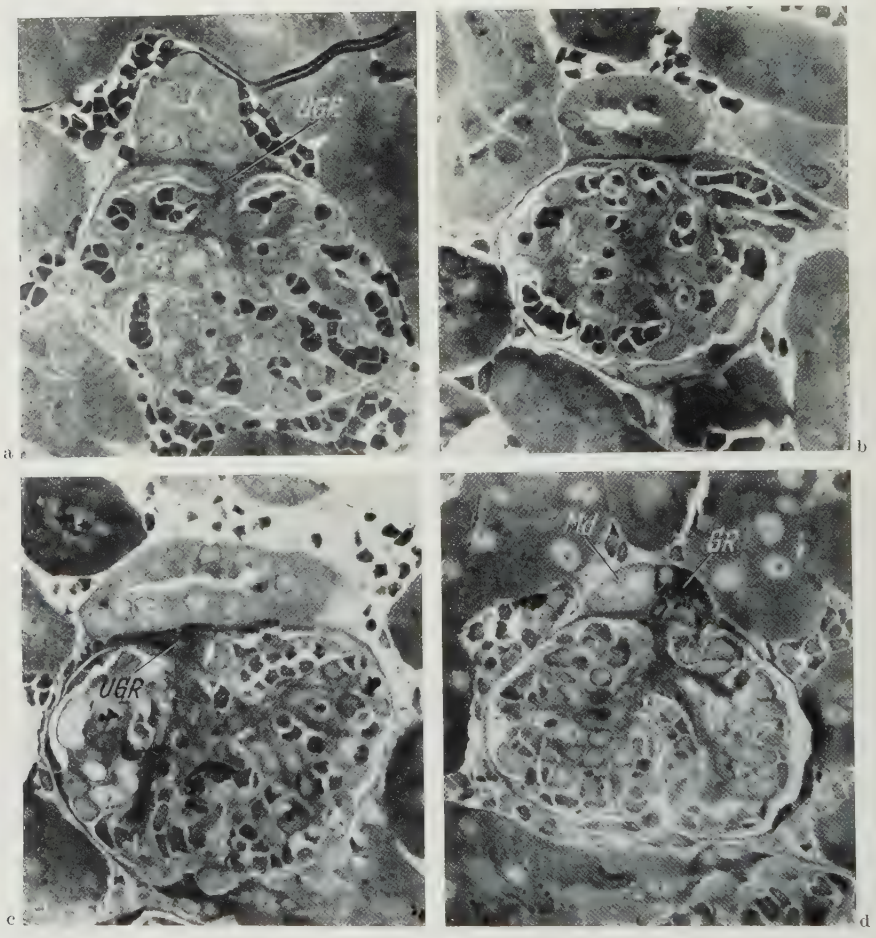


Abb. 1a—c. Quer-, Schräg- und Längsschnitt durch distalen Tubulus in Höhe der Macula densa. *UGR* Ungranulierte Zellen des juxtaglomerulären Zellhaufens. d Macula densa (*Md*) im Anschnitt. *GR* granulierte Zellen des juxtaglomerulären Zellhaufens (Lumen des Vas afferens nicht getroffen). OsO_4, Giemsa, Schnittdicke 1—2 μ. Lichtmikroskopisch 600:1

so daß sie z. B. bei Erweiterung des Tubulus gelöst werden kann. Die Zellen sind von einer distinkten Basalmembran (*Bm*) unterlagert. Grenzen sie an intertubuläre Kapillaren, was für die Mehrzahl zutrifft, so haben Epithel und (meist porenhaltiges) Endothel eine gemeinsame Basalmembran.

Bei den *Macula-Epithelien* (Abb. 3, linke Bildhälfte; Abb. 4) zeigt der apikale Zellteil praktisch das gleiche Bild, einschließlich der lockeren, lumennahen Verzahnung (*Vz*) oberhalb der Schlußleisten (*SL*). Dagegen sind die basalen Membranfaltungen wesentlich seltener, vor allem aber weniger tief. Daraus erklärt sich

einmal, daß die seitlichen Zellmembranen weitgehend gestreckt oder nur leicht geschlängelt verlaufen, zum anderen, daß die Verzahnung der Zellen untereinander

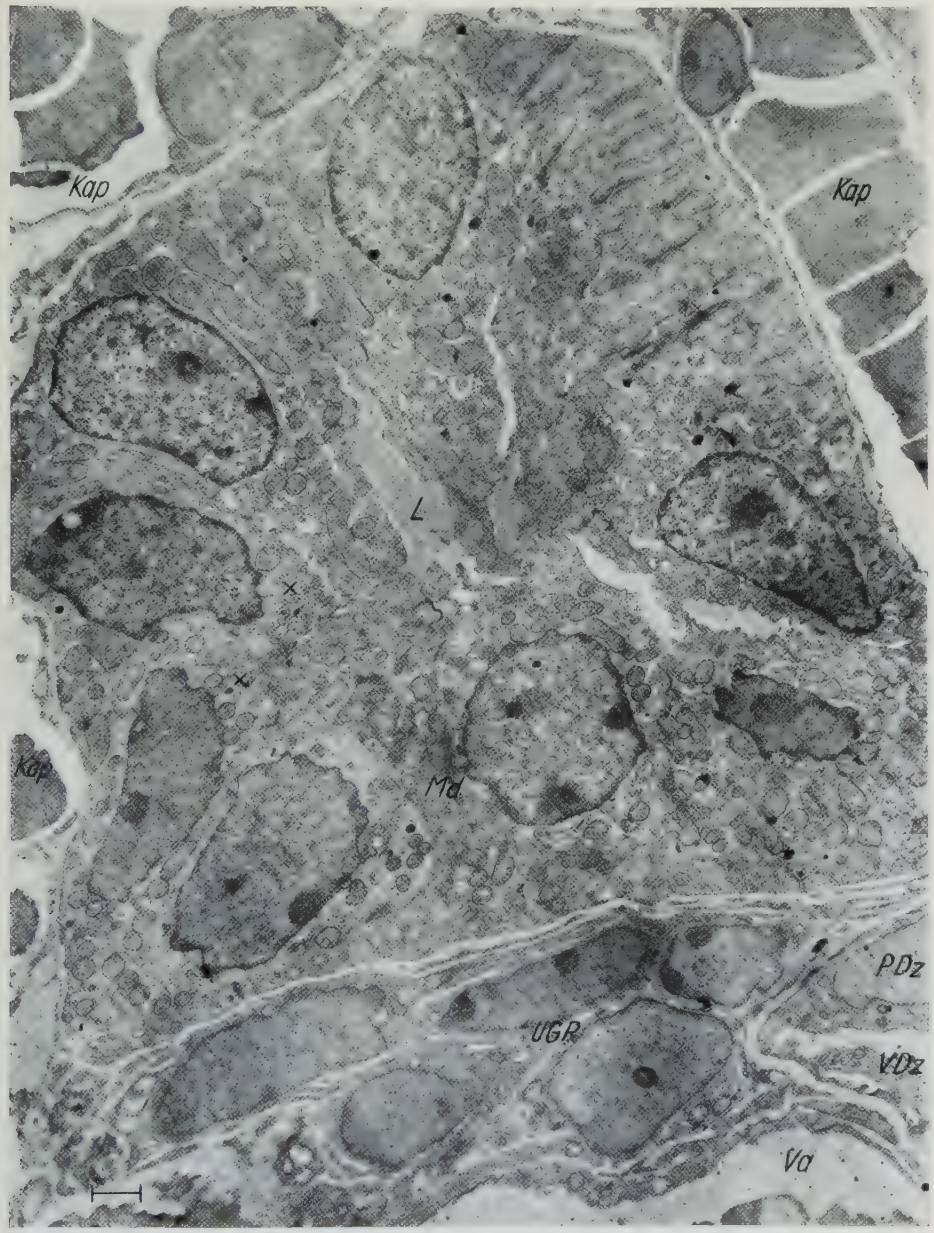


Abb. 2. Querschnitt durch distalen Tubulus mit Macula densa (*Md*). (Elektronenmikroskopisches Übersichtsbild-Parallelschnitt zu Abb. 1a). Unterschiedliche Struktur der Epithelien in der (glomerulum-zugewandten) Macula densa und im gegenüberliegenden (glomerulum-abgewandten) Wandabschnitt. Zwei Epithelien in der linken Bildhälfte (×) sind solche vom „Macula-Typ", obwohl sie nicht an das Glomerulum grenzen. Zwischen intraglomerulärem Vas afferens (*Va*) und Macula densa (*Md*) Gruppe ungranulierter Polkissenzellen (*UGR*). Rechts unten Umschlagstelle vom parietalen (*PDz*) in viscerales (*VDz*) Blatt der Bowmanschen Kapsel. *Kap* peritubuläre Kapillaren. 6000:1

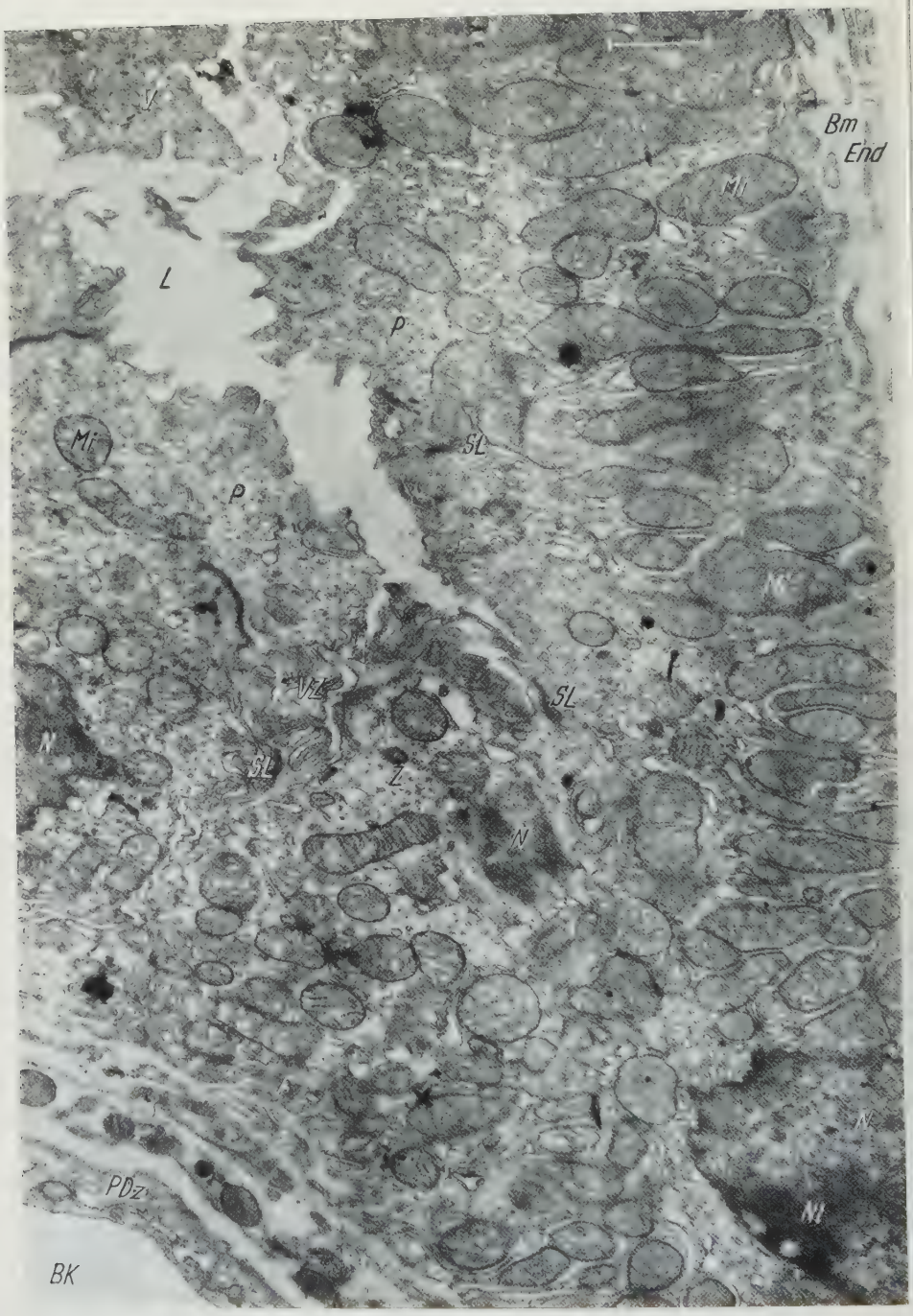


Abb. 3. Distaler Tubulus mit Macula densa. Rechts typische distale Tubuluscpithelien. Mitte unten und links Epithelien der Macula densa. *N* Zellkern, *Nl* randständiger Nukleolus, *P* RNP-Partikel, *Z* Zentriol, *SL* Schlußleiste, *Fz* lumennahe Verzahnung der Epithelien oberhalb der Schlußleiste. *L* Tubuluslumen, *F* Faltenbildung der basalen Zellmembran. *Bm* Basalmembran, *PDz* parietale Deckzelle der Bowmanschen Kapsel, *BK* Bowmanscher Kapselraum. *End* (peritubuläre) Kapillare. 14000:1

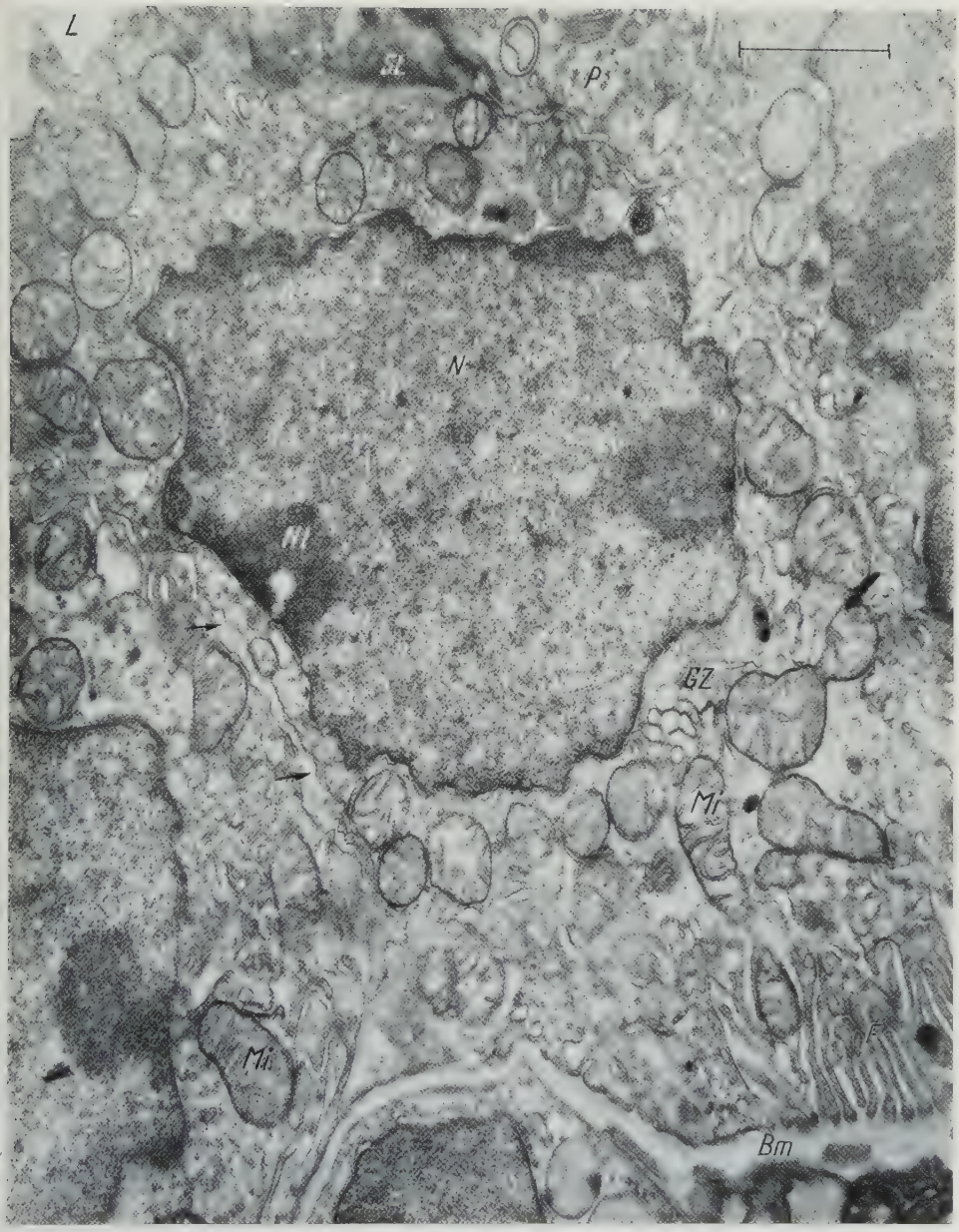


Abb. 4. Epithel der Macula densa mit weitgehend gestreckten, seitlichen Zellmembranen (→). Zellbasis teils geschlossen, teils mit kurzen Einfaltungen (*F*) versehen. Mitochondrien (*Mi*) mit überwiegend rundlichen Schnittflächen und locker stehenden Cristae, gleichmäßig im Zelleib verteilt. *P* RNP-Partikel in lockerer Anordnung. *N* Zellkern mit randständigem Nukleolus (*Nl*). *L* Tubuluslumen. *Bm* Basalmembran. 20000:1

bei weitem nicht so tiefgreifend ist und nur ganz basisnah erfolgt. Die Mitochondrien (*Mi*) sind gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt, zudem sind sie wesentlich kleiner, geringer an Zahl, und zeigen überwiegend rundliche Schnittflächen bei locker stehenden Cristae. Die RNP-Partikel (*P*) liegen in Gruppen zu 4—5

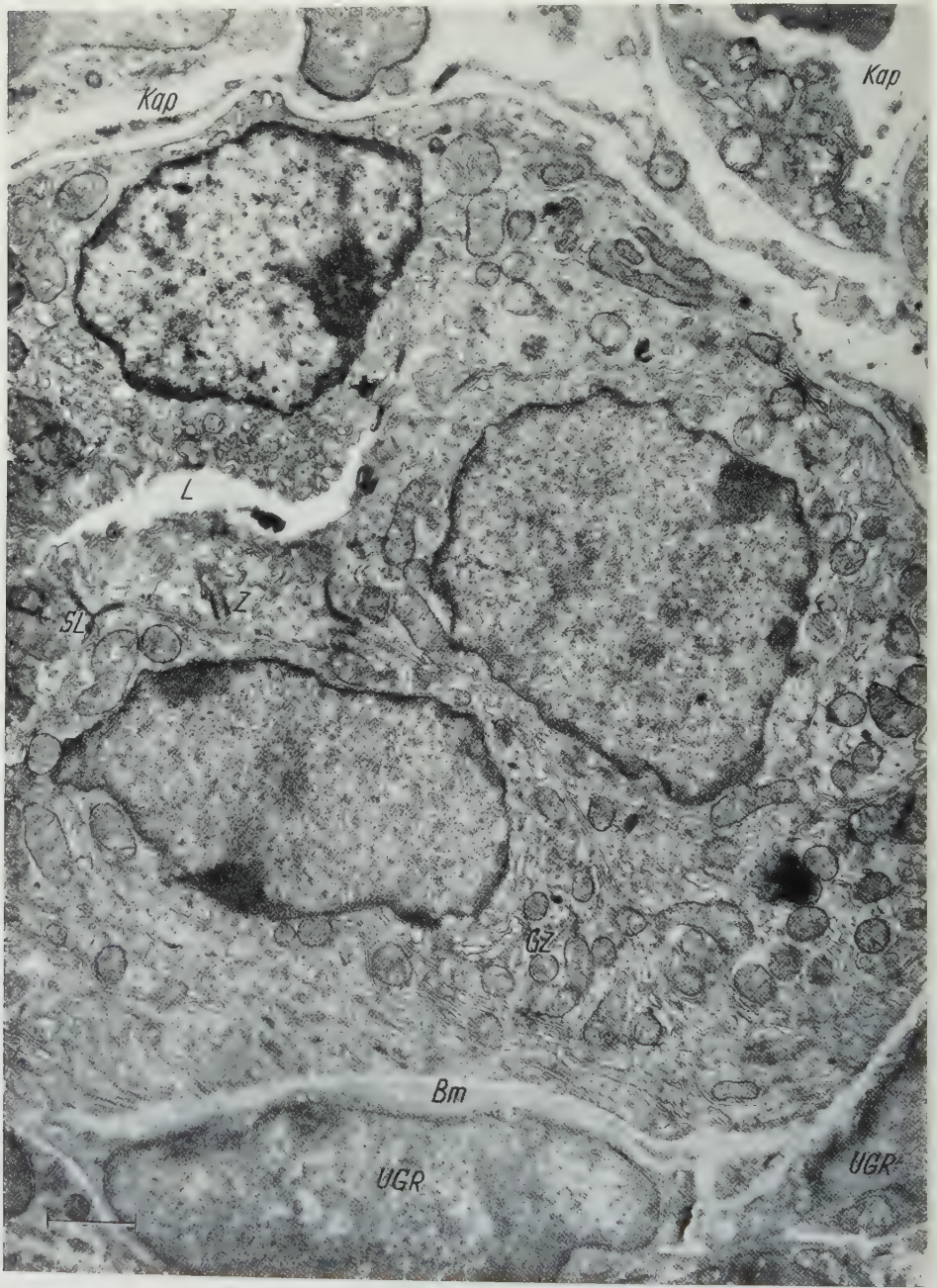


Abb. 5. Distaler Tubulus mit Macula densa, unten an Glomerulum grenzend. Der gesamte Wandumfang, also auch die glomerulum-*ab*gewandte Seite wird von Epithelien des Macula-Typs gebildet. *Z* Zentriol. *GZ* Golgi-Zone. *SL* Schlußleiste. *L* Tubuluslumen. *Kap* Peritubuläre Kapillaren. *Bm* Basalmembran. *UGR* ungranulierte, juxtaglomeruläre Zellen. 12000:1

locker im Zytoplasma verstreut, daher erscheinen die Macula-Epithelien transparenter. In den Zellkernen (*N*) finden sich die Nukleolen (*Nl*) ebenfalls meist

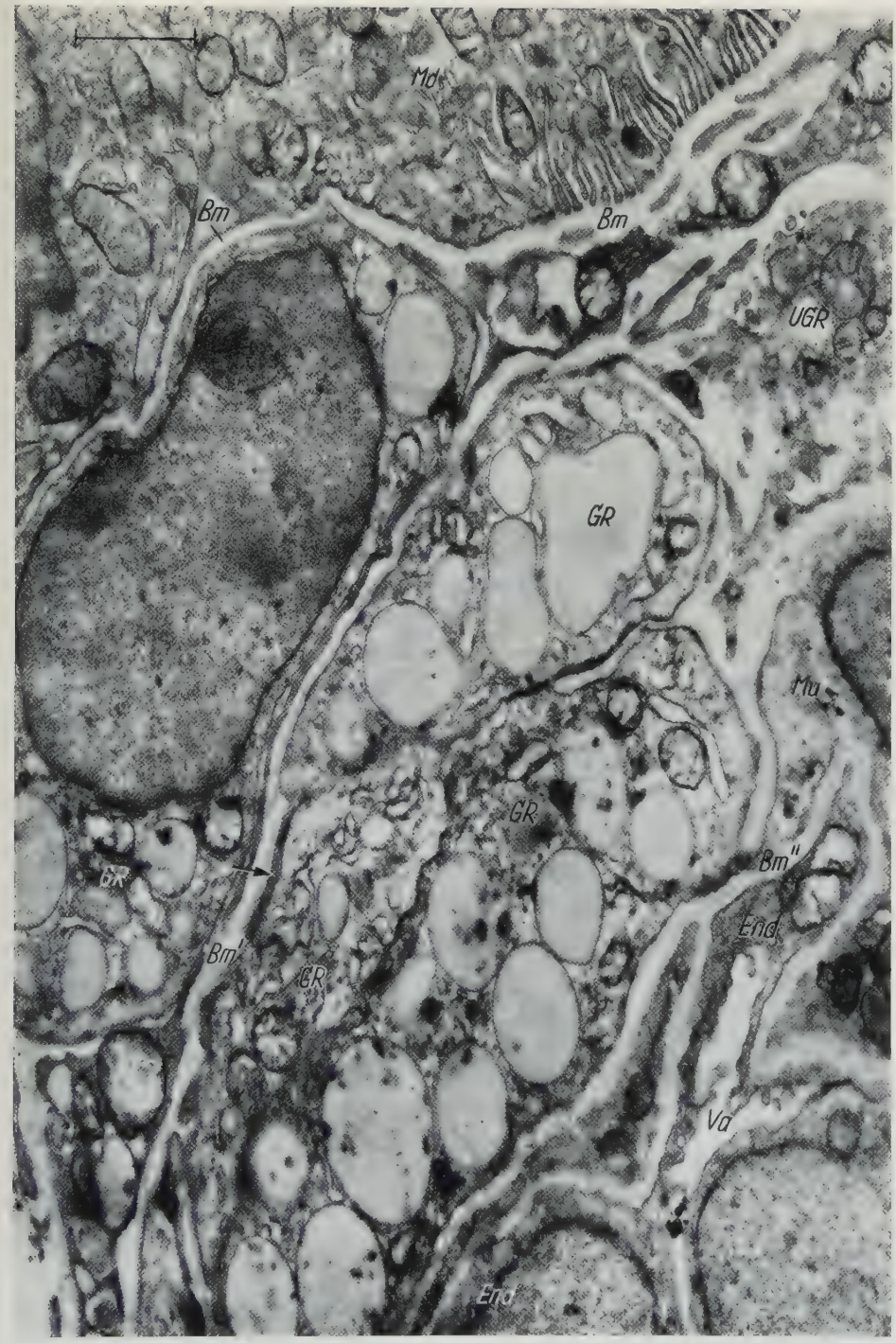
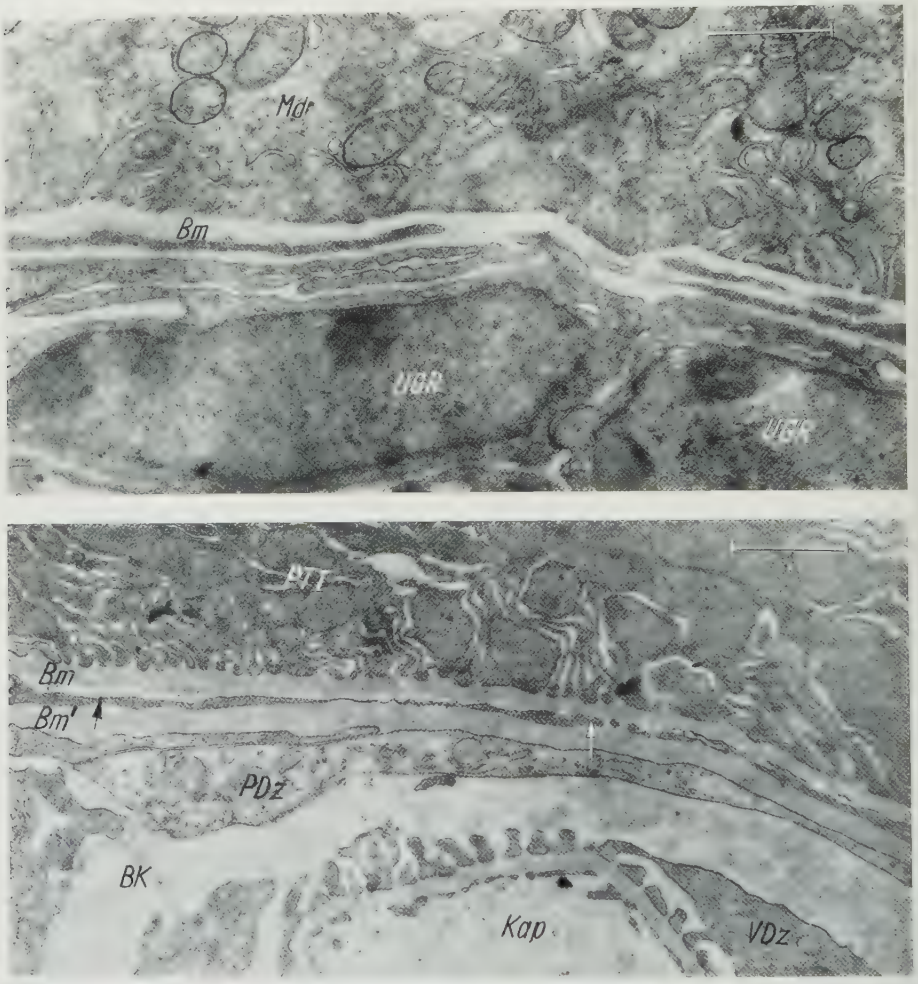


Abb. 6. Macula densa (*Md*) in engem Kontakt mit granulierten Polkissenzellen (*GR*), die auf der anderen Seite an das Vas afferens (*Va*) grenzen. *Bm* Basalmembran zwischen Macula-Epithel und granulierten Zellen, übergehend in die basalmembranartigen Massen (*Bm'*) zwischen den juxtaglomerulären Zellen. *Bm''* Basalmembran zwischen granulierten Zellen und Endothel (*End*) des Vas afferens. *UGR* ungranulierte Polkissenzellen mit flachen Zellausläufern. Man beachte, daß auch die granulierten Zellen flache Fortsätze bilden können (→). *Mu* Glatte Muskelzelle des Vas afferens. 16000:1

randständig, im übrigen zeigen die Kerne des Macula-Epithels keine Besonderheiten, vor allem haben sie etwa die gleiche Größe wie die des benachbarten Epithels.



a

b

Abb. 7. a Grenzzone: Macula densa — ungranulierte Polkissenzellen. Mehrere, flache Fortsätze der Polkissenzellen unterhalb des Macula-Epithels. *Bm* Basalmembran des Macula-Epithels. 16000:1. b Beliebige Kontaktstelle zwischen proximalem Tubulus, I. Teil (*PTI*) und Bowmanscher Kapsel (*PDz* Parietale Deckzelle, *BK* Bowmanscher Kapselraum, *VDz* Viscerale Deckzelle). Flacher Zellausläufer (→) zwischen den Basalmembranen des Tubulus (*Bm*) und der Glomerulumkapsel (*Bm'*). Reiches Falten- und Labyrinthsystem des Tubulusepithels. *Kap* Glomerulumkapillare. 15000:1

Übergangsformen zwischen dem typischen distalen Tubulusepithel und dem Macula-Epithel haben wir niemals gesehen. Beide Epithelformen stehen vielmehr in ihrer Verschiedenartigkeit unvermittelt nebeneinander.

Die eingangs erwähnte, strukturelle Unterscheidung der Epithelien nach ihrer Lage im glomerulum-zugewandten oder -abgewandten Wandabschnitt entspricht dem häufigsten Befund. In einzelnen Fällen haben wir jedoch Abweichungen von diesem Prinzip gesehen insofern, als der gesamte Umfang aus Epi-

thelien des Macula-Typs gebildet wurde. Ein Beispiel dafür gibt Abb. 5. Bei genauer Betrachtung erkennt man auch auf der ersten Übersichtsaufnahme (Abb. 2), daß zwei Zellen (×), die in der linken Bildhälfte nicht mehr an das Glomerulum, sondern an Kapillaren grenzen, dem Macula-Typ entsprechen.

Die *Verbindung der Macula densa* mit dem Glomerulum bzw. dem Vas afferens erfolgt stets über die juxtaglomerulären Zellen. In Abb. 7a erkennt man, daß die *ungranulierten* Zellen, die perinukleär nur einen schmalen, dichten Zytoplasmasaum mit wenig Mitochondrien aufweisen, zahlreiche, sehr flache Fortsätze bilden Einige dieser Fortsätze sind — häufig zu mehreren übereinandergeschichtet — unterhalb des Macula-Epithels angeordnet. Sie schieben sich von hieraus auch zwischen das Macula-Epithel und das parietale Blatt der Bowmanschen Kapsel. Derartige Zellausläufer zwischen Tubulusepithel und Glomerulum sind allerdings keine Spezialität des juxtaglomerulären Apparates, sie finden sich — als Ausläufer von Fibrozyten oder Endothelzellen — sehr häufig auch an anderen, gefäßpolfernen Berührungsstellen zwischen Tubuli und Glomerulumkapsel, hier allerdings meist in der Einzahl (s. Abb. 7b). In Übereinstimmung mit früheren, lichtmikroskopischen Befunden (vgl. H. Becher 1949), jedoch im Gegensatz zu dem von Oberling und Hatt gezeigten Schema zeigt sich, daß die Macula-Epithelien auch zu den *granulierten* Zellen des juxtaglomerulären Zellhaufens in direktem Kontakt stehen (s. Abb. 6). Zwischen Macula densa und Vas afferens ist also in jedem Fall eine der beiden Zellgruppen des juxtaglomerulären Zellhaufens eingeschoben. Die Basalmembran des Macula-Epithels tritt im elektronenmikroskopischen Bild — im Gegensatz zum lichtmikroskopischen (Zimmermann 1933) — nicht als distinkte Membran hervor, sondern erscheint hier als Teil jener basalmembranartigen Massen, in welche sämtliche juxtaglomerluäre Zellen eingebettet sind (Bohle 1959, Oberling und Hatt 1960, Bucher und Reale 1961).

Besprechung

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Macula densa und ihrer Verbindung zum Glomerulum bzw. zu den übrigen Teilen des „juxtaglomerulären Apparates" ergibt folgendes:

1. Die Macula-Epithelien weisen — im Gegensatz zu den Epithelien des distalen Tubulus — einen höchstens angedeutet polaren Bauplan auf: Die Zellbasis zeigt keine oder nur sehr kurze Einfaltungen der basalen Zellmembran. Die auffallend kleinen und weniger zahlreichen Mitochondrien sind gleichmäßig im Zelleib verteilt. Die RNP-Partikel liegen im Zytoplasma weniger dicht, so daß die Zellen transparenter erscheinen.

2. Übergangsformen zwischen den Macula-Epithelien und den benachbarten Epithelien des distalen Tubulus wurden nicht beobachtet.

3. Das Vorkommen der Epithelien vom Macula-Typ ist nicht immer auf die eigentliche Macula densa, also auf die Kontaktstelle mit dem Glomerulum beschränkt. In einzelnen Fällen wird sogar der gesamte Umfang des kurzen Tubulusabschnittes, dem die Macula densa angehört, von Epithelien des Macula-Typs gebildet.

4. Die Macula-Epithelien stehen in engem Kontakt mit den (granulierten und ungranulierten) juxtaglomerulären Zellen, die zwischen Macula densa und Vas afferens liegen.

Zur Erörterung der Frage, ob der elektronenmikroskopisch erkennbaren Feinstruktur der Macula-Epithelien Hinweise auf deren funktionelles Verhalten zu entnehmen sind, vergleicht man sie am besten mit den benachbarten Epithelien des distalen Tubulus. Die letzteren sind durch ihren Mitochondrien-Reichtum und den typischen, von mehreren Autoren (Pease 1955b, Rhodin 1958, Thoenes 1961a) beschriebenen, polaren Bauplan (tiefe Einfaltungen der basalen Zellmembran, dadurch bedingte Bildung des „basalen Labyrinthes" (Ruska u. Mitarb. 1957), Massierung der Mitochondrien an der Zellbasis) als Zellen mit der Fähigkeit des aktiven, transzellulären Transportes gekennzeichnet, und zwar vornehmlich eines Transportes, der — im Dienste der Rückresorption — vom Tubuluslumen zum Interstitium bzw. zur Kapillare gerichtet ist.

Bei den Macula-Epithelien hingegen sind sowohl das basale Falten- und Labyrinth-System als auch das Chondriom quantitativ wesentlich geringer entwickelt. Besonders im Umfang des Chondrioms ist einer der Hauptunterschiede der beiden Zellarten zu erblicken.

Rein morphologisch erklärt sich hieraus z.B. das Phänomen des „Kernreichtums" der Macula densa: Wegen der geringen Zahl und Größe der Mitochondrien nimmt im Macula-Epithel das zu jedem Zellkern gehörige Zytoplasma einen vergleichsweise kleinen Raum ein. Bei gleicher Kerngröße wird daher das Territorium jeder einzelnen Zelle kleiner und damit auch der Abstand der Zellkerne voneinander.

An die Ausbildung des Chondrioms knüpfen auch die Überlegungen bezüglich der Funktion an. Da die Zellen der Nierenrinde ihren Energiebedarf fast ausschließlich auf oxydativem Wege decken, kann aus dem geringen Umfang des Chondrioms als dem Träger der Enzyme der Atmungskette und der oxydativen Phosphorylierung geschlossen werden, daß der Energiebedarf der Macula-Epithelien wesentlich geringer ist als der der benachbarten, mitochondrienreichen Tubulusepithelien. Bedenkt man weiterhin, daß die Macula-Epithelien nicht — wie der größte Teil der Tubulusepithelien — an Kapillaren, sondern an den „soliden" Gefäßpol des Glomerulums grenzen, so bieten sich für die funktionelle Interpretation der beobachteten Zellstrukturen zunächst zwei Möglichkeiten:

1. Wegen des fehlenden Abflußweges (Kapillaren) kann das Macula-Epithel im Gegensatz zum benachbarten Tubulusepithel nicht resorptiv tätig sein, weshalb es gewissermaßen „verkümmert".

2. Das Macula-Epithel ist ebenso wie die benachbarten Tubulusepithelien resorptiv tätig, jedoch in wesentlich geringerem Umfang, so daß ein mitochondrienreiches Falten- und Labyrinth-System an der Zellbasis nicht erforderlich ist.

Ad 1: Da die Anhaftung des distalen Tubulus am Gefäßpol des Glomerulum nach Peter (1927) bereits im 2. Fetalmonat besteht, andererseits die volle Differenzierung des Tubulusepithels bis zu der oben erwähnten Feinstruktur nach Untersuchungen von Clark (1957) in nennenswertem Umfang erst nach der Geburt, also mit Einsetzen der Funktion erfolgt, wäre es denkbar, daß das Macula-Epithel wegen des fehlenden Abflußweges für die Resorption (Kapillaren) eine entsprechende Ausgestaltung postembryonal nicht erfährt.

Für eine solche funktionsabhängige Zelldifferenzierung könnte der deutliche Unterschied zwischen dem glomerulum-abgewandten Tubulus- und dem glomerulumzugewandten Macula-Epithel angeführt werden. Dieses Argument ist jedoch nicht stichhaltig, da gelegentlich, wie wir gezeigt haben (Abb. 5), die Macula-Epithelien die gesamte Zirkumferenz — also auch den an Kapillaren grenzenden Wandteil —

des betreffenden Tubulusabschnittes einnehmen. Hinzu kommt, daß an beliebigen Kontaktstellen zwischen proximalem bzw. distalem Tubulus und Glomerulumkapsel (Abb. 7) die Tubulusepithelien ihre komplizierte Basalstruktur auch dann beibehalten, wenn eine Kapillare oder wenigstens ein etwas weiterer, interstitieller Raum als Abflußweg für das Resorbat der Tubulusepithelien nicht zur Verfügung steht.

Ad 2: Bei aller Verschiedenheit der Macula-Epithelien und der benachbarten distalen Tubulusepithelien sind sie histogenetisch doch eng miteinander verwandt. Es liegt daher nahe, an eine prinzipiell gleichartige Funktion der beiden Zellarten zu denken. Geht man davon aus, daß zwischen der resorptiven Leistung einer Tubuluszelle und der Ausprägung sowohl des Chondrioms wie des basalen Falten- und Labyrinth-Systems eine direkte Parallele besteht, so würde man die Macula-Epithelien als Zellen mit einer geringen, resorptiven Leistung ansehen können: Das Chondriom ist wesentlich kleiner als bei den stark resorptiv tätigen Epithelien des proximalen und distalen Tubulus, es erscheint aber doch zu groß, um es lediglich auf den zellulären Erhaltungsstoffwechsel zu beziehen, so daß man eine aktive, funktionelle Leistung geringeren Ausmaßes annehmen darf. Was die wenig ausgeprägte, basale Membranfaltung anbelangt, so stehen wir hier vor der gleichen Frage wie z. B. bei den Sammelrohrepithelien (Pease 1955a, Thoenes 1961b). Handelt es sich dabei lediglich um den Ausdruck eines im gesamten Nephron verwirklichten Bauprinzip, dem nicht immer eine funktionelle Bedeutung zukommt, oder ist es im Sinne der Oberflächenvergrößerung in jedem Falle funktionell zu bewerten? Wir neigen zu der letzteren Ansicht und vermuten, daß die — wenn auch geringe — Oberflächenvergrößerung an der Basis des Macula-Epithels die Voraussetzung für eine —gleichfalls geringe — resorptive Transportfunktion schafft.

Danach wären die Macula-Epithelien in Übereinstimmung mit den Vorstellungen von Oberling und Hatt (1960) geeignet, Informationen über die Zusammensetzung des Tubulusharnes dem Gefäßpol des Glomerulum zu übermitteln, in erster Linie den direkt angrenzenden, juxtaglomerulären Zellen.

Wohin die „Informationsflüssigkeit" aus dem Polkissen schließlich abfließt, ist aus dem morphologischen Bild nicht ohne weiteres zu entnehmen. Wenn es sich, wie wir annehmen, nur um kleine Mengen handelt, wäre der Abfluß an der Glomerulumkapsel vorbei in das intertubuläre Interstitium vorstellbar.

Das morphologische Bild sagt allerdings nichts darüber aus, welcher Art die Information ist, die den juxtaglomerulären Zellen im einzelnen übermittelt wird. Da die Zusammensetzung und damit auch der osmotische Druck des Harnes am Anfang des distalen Konvolutes von der Tätigkeit der hypothetischen Haarnadelgegenstrom-Vorrichtung (Henlesche Schleife) abhängt (Hargitay und Kuhn 1951, Wirz 1956, Gottschalk und Mylle 1959, Ullrich 1959, Kuhn 1959), wäre z. B. an Informationen im Zusammenhang mit dem jeweiligen Diurese-Zustand der Niere zu denken. Unseres Wissens ist die Tubulusflüssigkeit in diesem Nephronabschnitt bei *verschiedenen* Diurese-Zuständen bisher nur von Wirz (1956) untersucht worden. Zwar fanden sich hierbei zwischen konzentrierender und verdünnender Niere nur relativ geringe Unterschiede des osmotischen Druckes; es wäre aber denkbar, daß sich die Information nicht so sehr auf den osmotischen Druck, also auf die Gesamtheit der gelösten Substanzen, sondern auf bestimmte Solute, wie z. B. Na^+-Ionon erstreckt; denn Untersuchungen von

Ullrich u. Mitarb. (1958) am Sammelrohrharn haben gezeigt, daß sich die stoffliche Zusammensetzung des Harnes sehr wohl unabhängig vom osmotischen Druck ändern kann. Sollten sich derartige, vom jeweiligen Funktionszustand des HG-Systems abhängige Änderungen der Zusammensetzung des Harnes in diesem Tubulusabschnitt bestätigen, so würde die Bedeutung der Macula densa als Übermittlerin von Informationen zwischen Tubulus und juxtaglomerulären Zellen (mit ihrer möglicherweise in den Mineralstoffwechsel eingreifenden Funktion, vgl. Bohle 1959) eine entscheidende Stützung erfahren. Es würde dann auch verständlich, daß die Macula densa in diesem Nephronabschnitt — am Übergang von der Henleschen Schleife zum distalen Tubuluskonvolut — angeordnet ist.

Zusammenfassung

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Macula densa im Nephron der Maus zeigen, daß sich das Macula-Epithel von dem benachbarten Epithel des distalen Tubulus wesentlich unterscheidet. Das Macula-Epithel hat einen nur angedeutet polaren Bauplan: die Einfaltungen der basalen Zellmembran sind spärlich und kurz, die Mitochondrien deutlich geringer an Zahl und Größe und gleichmäßig im Zelleib verteilt. Es zeigt sich, daß Epithelien vom Macula-Typ auch außerhalb der eigentlichen Macula densa vorkommen, daß sie gelegentlich sogar den ganzen Wandumfang dieses Tubulusabschnittes bilden.

Aus dem Vergleich der Macula-Epithelien mit den übrigen distalen Tubulusepithelien wird abgeleitet, daß die Epithelien der Macula densa am ehesten als Zellen mit einer beschränkten resorptiven Leistung anzusehen sind. Sie kommen daher als Übermittler von Informationen zwischen Tubulusharn und juxtaglomerulären Zellen in Frage. Es wird darauf hingewiesen, daß die Macula densa in einem physiologisch interessanten Abschnitt liegt, nämlich am Übergang von der (hypothetischen) Haarnadelgegenstrom-Vorrichtung der Niere zum distalen Tubuluskonvolut.

Literatur

Becher, H.: Über besondere Zellengruppen und das Polkissen am Vas afferens in der Niere des Menschen. Z. wiss. Mikr. **53**, 205—214 (1936).

— Die gestaltlichen Grundlagen der Strombahnsteuerung am Gefäßpol der Malpighischen Körperchen in der menschlichen Niere. Ärztl. Forsch. **3**, 351—367 (1949).

Bohle, A.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Struktur des Gefäßpoles der Niere. Verh. Dtsch. Ges. Path. 43. Tagg, 219—225 (1959).

Bucher, O., u. E. Reale: Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung der juxtaglomerulären Spezialeinrichtungen der Niere. I. Mitteilung: Problemstellung und erste Beobachtungen. Z. Zellforsch. **54**, 167—181 (1961).

Clark, S. L.: Celiular differentiation in the kidney of newborn mice studied with the electron microscope. J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 349—362 (1957).

Goormaghtigh, N.: Les segments neuro-myo-artériel juxta-glomérulaires du rein. Arch. Biol. (Liège) **43**, 575—591 (1932).

— La fonction endocrine des artérioles rénalés et sa signification. J. Urol. méd. chir. **57**, 467—471 (1951).

Gottschalk, C. W., and M. Mylle: Micropuncture study of the mammalian urinary concentrating mechanism: evidence for the counter-current hypothesis. Amer. J. Physiol. **196**, 927—936 (1959).

Hargitay, B., u. W. Kuhn: Das Multiplikationsprinzip als Grundlage der Harnkonzentrierung in der Niere. Z. Elektrochem. **55**, 539—558 (1951).

Kellenberger, F., W. Schwab et A. Ryter: L'utilisation d'un copolymere du group de polyesters comme matérial d'inclusion en ultramicrotome. Experientia (Basel) **12**, 421—422 (1956).

Kroon, D. B.: Origin of PAS-positive granulated cells of the juxta-glomerular apparatus. Acta anat. (Basel) **41**, 138—156 (1960).

Kuhn, W.: Das Haarnadelgegenstrom-Prinzip als Grundlage der Harnkonzentrierung in der Niere. Klin. Wschr. **37**, 997—1003 (1959).

Oberling, Ch., et P. Y. Hatt: Ultrastructure de l'appareil juxta-glomerulaire du rat. C. R. Acad. Sci. (Paris) **250**, 929—930 (1960).

Pease, D. C.: Fine structure of the kidney seen by electron microscopy. J. Histochem. Cytochem. **3**, 295—301 (1955a).

— Electron microscopy of the tubular cells of the kidney cortex. Anat. Rec. **121**, 723—736 (1955b).

Peter, K.: Untersuchungen über Bau und Entwicklung der Niere. Jena: Gustav Fischer 1927.

Rhodin, J.: Anatomy of the kidney tubules. Int. Rev. Cytol. **7**, 485—534 (1958a).

— Electron microscopy of the kidney. Amer. J. Med. **24**, 661—675 (1958b).

Ruska, H., D. H. Moore and J. Weinstock: The base of the proximal convoluted tubule cells of rat kidney. J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 249—254 (1957).

Ruyter, J. H. C.: Über einen merkwürdigen Abschnitt der Vasa afferentia in der Mäuseniere. Z. Zellforsch. **2**, 242—248 (1925).

Thoenes, W.: Giemsa-Färbung an Geweben nach Einbettung in Polyester („Vestopal") und Methacrylat. Z. wiss. Mikr. **64**, 406—413 (1960).

— Die Mikromorphologie des Nephron in ihrer Beziehung zur Funktion. Teil I: Funktionseinheit: Glomerulum — Proximales und distales Konvolut. Klin. Wschr. **39**, 504—518 (1961a).

— Die Mikromorphologie des Nephron in ihrer Beziehung zur Funktion. Teil II: Funktionseinheit: Henlesche Schleife — Sammelrohr. Klin. Wschr. **39**, 827—839 (1961b).

Ullrich, K. J.: Physiologie der Harnkonzentrierung und -verdünnung, in: Diurese und Diuretika. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1959.

—, u. F. W. Eigler: Sekretion von Wasserstoffionen in den Sammelrohren der Säugetierniere. Pflügers Arch. ges. Physiol. **267**, 491—496 (1958).

— H. H. Hilger u. J. D. Klümper: Sekretion von Ammoniumionen in den Sammelrohren der Säugetierniere. Pflügers Arch. ges. Physiol. **267**, 244—250 (1958).

Wirz, H.: Der osmotische Druck in den corticalen Tubuli der Rattenniere. Helv. physiol. pharmacol. Acta **14**, 353—362 (1956).

Zimmermann, K. W.: Über den Bau des Glomerulus der Säugerniere. Z. mikr.-anat. Forsch. **32**, 176—278 (1933).

Dr. W. Thoenes,
Pathologisches Institut der Universität, Würzburg, Luitpoldkrankenhaus

Zeitschrift für Zellforschung 55, 500—513 (1961)

From the Department of Anatomy and Histology, the Laboratory of Electron Microscopy, Veterinärhögskolan, and the Department of Histology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

THE BOVINE OVIDUCT EPITHELIUM AND ITS SECRETORY PROCESS AS STUDIED WITH THE ELECTRON MICROSCOPE AND HISTOCHEMICAL TESTS*

By

Nils Björkman and Bengt Fredricsson

With 13 Figures in the Text

(Received May 30, 1961)

The secretion from the mammalian oviduct has long been a matter of dispute. Thus, the presence of secretory granules has sometimes even been denied, and different opinions are found regarding the details of the secretory process.

Like other parts of the differentiated Müllerian duct, the epithelium of the oviduct is influenced by the hormonal factors regulating the sexual cycle. Thus, during the period preceding oestrus nonciliated cells have been found to accumulate secretory material, which is released after ovulation. The knowledge obtained by light microscopy has now been widened by electron microscope studies of rabbit and rat (Borell et al. 1956, 1959; Nilsson 1958). The fine structure of the epithelium of the bovine oviduct has not been investigated. There exists only a study of the epithelial surface (Björkman and Fredricsson 1960), where a correlation of the microvilli of the ciliated cells with alkaline phosphatase activity was suggested. The secretory granules of the bovine oviduct were reported to contain glycogen (Weeth and Herman 1952), which is in contrast with the conditions in rat, mouse, rabbit, sheep and man (Fredricsson 1957, Hadek 1955).

The present study was designed to gather further information for the understanding of the secretory process of the Fallopian tube.

The material and its preparation

a) Material, fixation. The oviducts were obtained at the Slaughter House of Stockholm. Material for electron microscopy was taken from 13 apparently normal cows in different sexual phases (follicular 5, postovulatory 2, non-pregnant luteal 4, and pregnant luteal 1). The phase was determined by inspection of the ovaries and records of the reproductive history of the animal.

To secure rapid fixation, the slaughtering schedule was modified to obtain the oviducts immediately after the animals had been shot and bled. Small pieces of tissue from the ampullary part were fixed in Palade's fluid for 2 hours. After dehydration the tissue blocks were embedded in n-butylmethacrylate, which was polymerized at 60° C. Sections were made with a Porter-Blum ultramicrotome and examined in a Siemens Elmiskop I at initial magnifications of 1,400 to 21,000 diameters and an acceleration voltage of 80 kV.

Material for histochemistry was obtained from 20 cows, killed at various stages of the oestrus cycle. The oviducts of 12 cows were fixed in cold acetone and embedded in paraffin

* This investigation was supported by a grant from the foundation "Therése och Johan Anderssons Minne".

m.p. 52° C. The other eight specimens were freeze-dried and embedded in polyethylene glycol. Details and biochemical controls of this technique have been published previously (Fredricsson 1958). Post-fixation of the sections from the freeze-dried material was obtained by immersion in ethanol for 10 min or in gaseous formaldehyde produced by paraformaldehyde for one hour when not otherwise stated (cf. Fredricsson 1959b).

b) Histochemical tests. 1. *Basophilia* was demonstrated by staining with toluidine blue including controls digested with ribonuclease (Brachet 1953). The concentration of the enzyme was 0.1 mg/ml, and the sections were incubated at p_H 6 for one hour at 37° C (the preparation was obtained from the Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.). Extraction of other sections with water at the same p_H and temperature was also included in the test. The sections used for the demonstration of basophilia were postfixed over paraformaldehyde for 60 min, followed by Serra's solution (1946) for 15 min.

2. *Polysaccharides.* The periodic acid Schiff reaction (PAS) was performed using an alcoholic Schiff reagent (Mowry et al. 1952).

The diastase test was found to be dependent on the kind of fixation used, and the present material was especially sensitive to variations of this kind. In order to find the best conditions, sections of freeze-dried oviduct epithelium were subjected to different fixatives before the staining. Sections of freeze-dried rat liver were placed on the same slides to serve as controls of the diastase effect. The following post-fixations were tried:

1. Absolute ethanol, 10 min.
2. Gaseous formaldehyde, 60 min.
3. Gaseous formaldehyde, 60 min followed by 10% acetid acid, 10 min.
4. Gaseous formaldehyde, 60 min followed by 2% trichloroacetic acid, 10 min.
5. Gaseous formaldehyde, 60 min followed by 4.5% mercuric chloride, 10 min.
6. Gaseous formaldehyde, 60 min followed by Susa fixative, 10 min.

Material pretreated in this way was then stained with the PAS-technique. Controls were obtained by digestion in one per cent diastase solution for one or two hours at room temperature as recommended by Graumann (1959). The solvent consisted of phosphate buffer of p_H 6.5 (Lillie and Greco 1947). Controls were also extracted with the solvent alone. The diastase preparation was obtained from Merck AG, Darmstadt, Germany.

3. *Lipids* were demonstrated after postfixation over paraformaldehyde for 60 min, using a saturated solution of Sudan black B in 70% methanol as recommended by Meier (1959). No signs of non-specific staining were observed in this material.

4. *Acid phosphatase.* Fresh frozen section were used and an ordinary azo coupling method was tried, using α-naphthyl phosphate and diazotized o-aminoazotoluene (Fast Garnet GBC Salt, I.C.I. Ltd) (Pearse 1960).

5. *Non-specific esterase* was demonstrated by using α-naphthyl acetate as substrate in the presence of tetrazotized diorthoanisidine (Naphtanil Diazo Blue B, Du Pont de Nemours & Co, Boston) (Pearse 1960). The incubation period was 15 min, and the sections were postfixed over paraformaldehyde for 30 min. Attempts were also made to demonstrate this enzyme with 5-brom-indoxyl-0-acetate according to Holt (1958), but no staining was obtained even after 2 hours' incubation.

Observations

a) Ultrastructural organization. The epithelium is simple columnar. The ciliated and secretory cells are of about the same size and outer shape (Fig. 1). They rest on an even basement membrane, which is double lined and has a thickness of about 30 mμ. The ciliated and secretory cells are mingled and cells of the same kind occur singly or in small groups. Occasionally rounded basal cells are also found, which seem not to be attached to the basement membrane. In the basal part of the epithelium narrow slits between the cells are found during the non-oestrogenic phase (Fig. 1), whereas during the oestrogenic phase large spaces are sometimes seen.

The ciliated cells were found to have a fairly constant ultrastructure throughout the sexual cycle.

The cell membranes between adjacent ciliated cells are as a rule straight. When bordering secretory cells the membranes sometimes are curled. Desmosomes of varying length are present at the borders of adjacent cells (Figs. 1, 7, 8).

Fig. 1. Survey picture, luteal phase. Ciliated (*C*) and secretory (*S*) cells with ovoid and lobated nuclei. Arrow indicates intercellular slit. Marked square is enlarged in Fig. 7. 6000 ×

The nuclei are placed in the apical third of the cells. They are ovoid in shape and rather large with distinct nucleoli. The nuclear envelope is even (Fig. 1).

The mitochondria are very numerous, especially in the supranuclear region. Varying in size within comparatively narrow limits they are small and slender. Exceptionally they may have a considerable length. The mitochondria are oriented parallel to the long axis of the cell. They are dense and their internal structure is obscured and difficult to discern.

The Golgi apparatus is variably located at some distance from the nucleus or it may have a juxtanuclear position. It consists of vesicles of varying size (Fig. 2). In the Golgi region there are sometimes ovoid bodies with high density and an irregular internal structure. The ovoid bodies resemble lysosomes and are found isolated or in clusters and in most cases closely related to the nucleus (Fig. 3).

The endoplasmatic reticulum is inconspicuous with very narrow cisternae. Ribonucleoprotein particles are found in small groups (Fig. 2).

The surface is provided with cilia and fingerlike microvilli, which have been described in a previous work (BJÖRKMAN and FREDRICSSON 1960).

The secretory cells have a more electron dense cytoplasm than the ciliated cells and vary in appearance depending on the phase of the sexual cycle. Contrary to the ciliated cells, which have a constant height, the secretory cells are more variable in this respect. Thus, they may be of the same height as the ciliated cells, the epithelium then presenting an even surface. More often, however, the

apical portions of the secretory cells bulge over the ciliated cells and form protrusions of varying shape and size.

The cell membrane follows a somewhat more tortuous course than in the ciliated cells, and sometimes it is reduplicated. Terminal bars and desmosomes are found between adjacent secretory cells, but they are smaller and less frequent than those between ciliated cells or between secretory and ciliated cells (Fig. 8).

The nuclei are in most cases placed in the basal third of the cells, but their position varies. Thus, they may also be found in the protrusions at the epithelial surface. The nuclei are very irregular in shape. They have deep fissures and often appear lobated with one or more narrow bridges connecting the lobes (Figs. 1, 5). The nucleoli are indistinct.

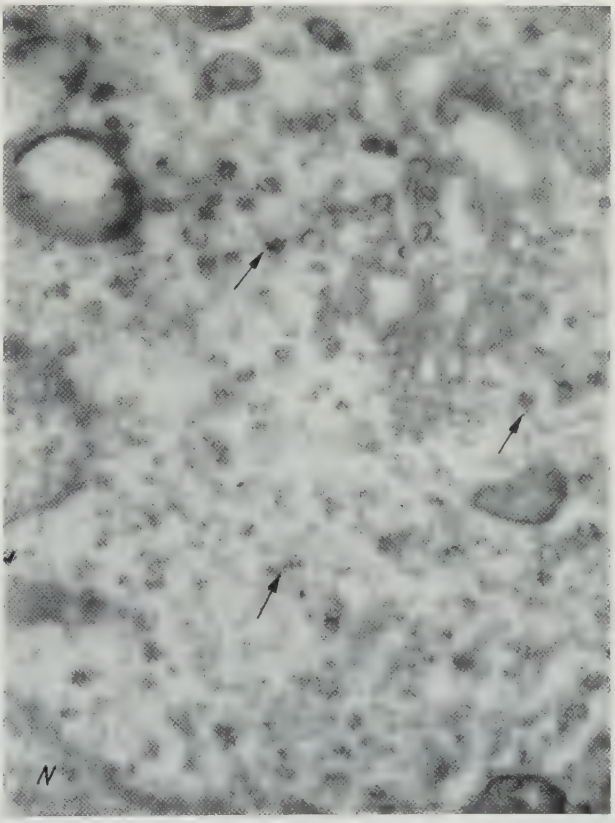


Fig. 2. Part of ciliated cell with Golgi apparatus (top right), dense body (top left), and ribonucleoprotein particles (arrows). *N* nucleus. 42000 ×

The secretory cells contain few mitochondria. These occur in the whole cytoplasm, but they are most frequent in the apical part. The mitochondria are significantly larger than in the ciliated cells. They are elongated though varying in length. The internal crests are very sparse (Figs. 6, 7, 8).

The Golgi apparatus is located in the supranuclear region. It is well developed and takes up a large portion of the cell. It contains lamellae and vesicles of varying size.

The endoplasmatic reticulum fills up most of the cytoplasm. The cisternae are closely packed and are associated with numerous ribonucleoprotein particles, thus forming an ergastoplasm. Thus, the cytoplasm is darker than in the ciliated cells. The appearance of the ergastoplasm depends to a great deal on the sexual phase. During the luteal phase or in anoestrus the cisternae have a relatively small lumen though much larger than in the ciliated cells (Fig. 1).

During the follicular phase the cisternae are dilated and form large cavities. In the infranuclear region the ergastoplasm has a lamellated appearance, and whorls are formed near the nucleus (Fig. 4). In the supranuclear region a more

vesicular picture is seen (Fig. 6). In the protrusions of the apical part of the cells, the degree of dilatation is most varying and the profiles of the cisternae have different shapes.

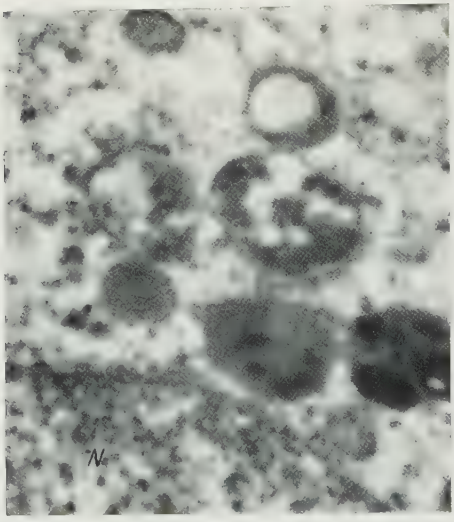


Fig. 3. Dense bodies (lysosomes) from ciliated cell. *N* nucleus. 24 000 ×

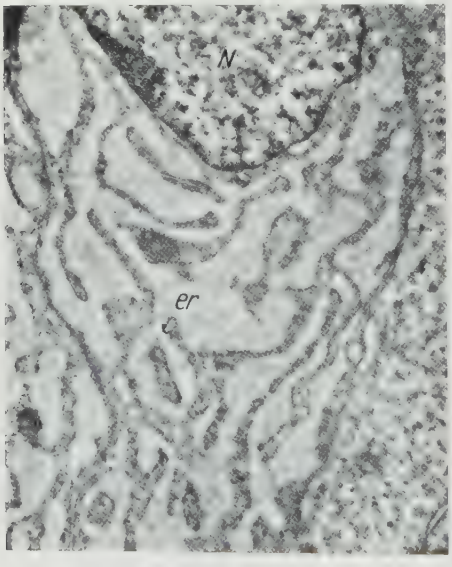


Fig. 4. Infranuclear part of secretory cell with dilated ergastoplasmic cisternae (*er*). *N* nucleus. Follicular phase. 11 000 ×

A characteristic feature is that the cisternae dip into the fissures between the lobes of the nuclei. Thus the cisternal system comes in close contact with the nucleus.

Secretion granules occur in all parts of the cytoplasm, but they are most frequent in the Golgi zone and in the apical parts of the cells. The granules have different size and density. The smallest of them are ovoid dense bodies measuring 0.3—0.4 μ. They appear to be made up by concentric lamellae with a spacing of about 20 mμ and a dark spot in the centre (Figs. 6, 8). Then the granules seem to undergo a swelling, growing sometimes to 1 μ in diameter. The distance between the lamellae increases and thus the density becomes diminished. In the largest granules the lamellae have ruptured into irregulary distributed needle shaped fragments (Figs. 6, 7, 8). The granules then empty their content into

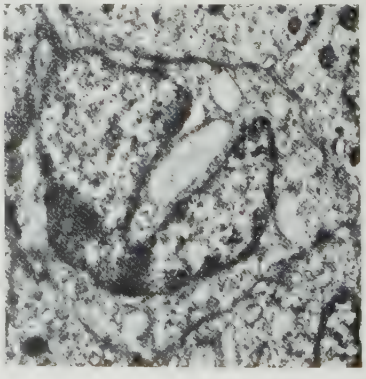


Fig. 5. Cross section of secretory cell with an ergastoplasmic cistern between the nuclear lobes. Luteal phase. 10 000 ×

the tubal lumen (Fig. 8). This process is best seen in specimens assumed to be in the follicular phase. Though the greatest amount has been found in cells from specimens in the follicular phase, granules are present at any time. Moreover, adjacent cells in the same section have been observed to be in different stages of secretory activity.

b) Histochemical observations. *1. Basophilia.* The general histological appearance of the epithelium of the bovine oviduct is well illustrated by the staining with toluidine blue (Fig. 9). The cytoplasm of the secretory cells is more baso-

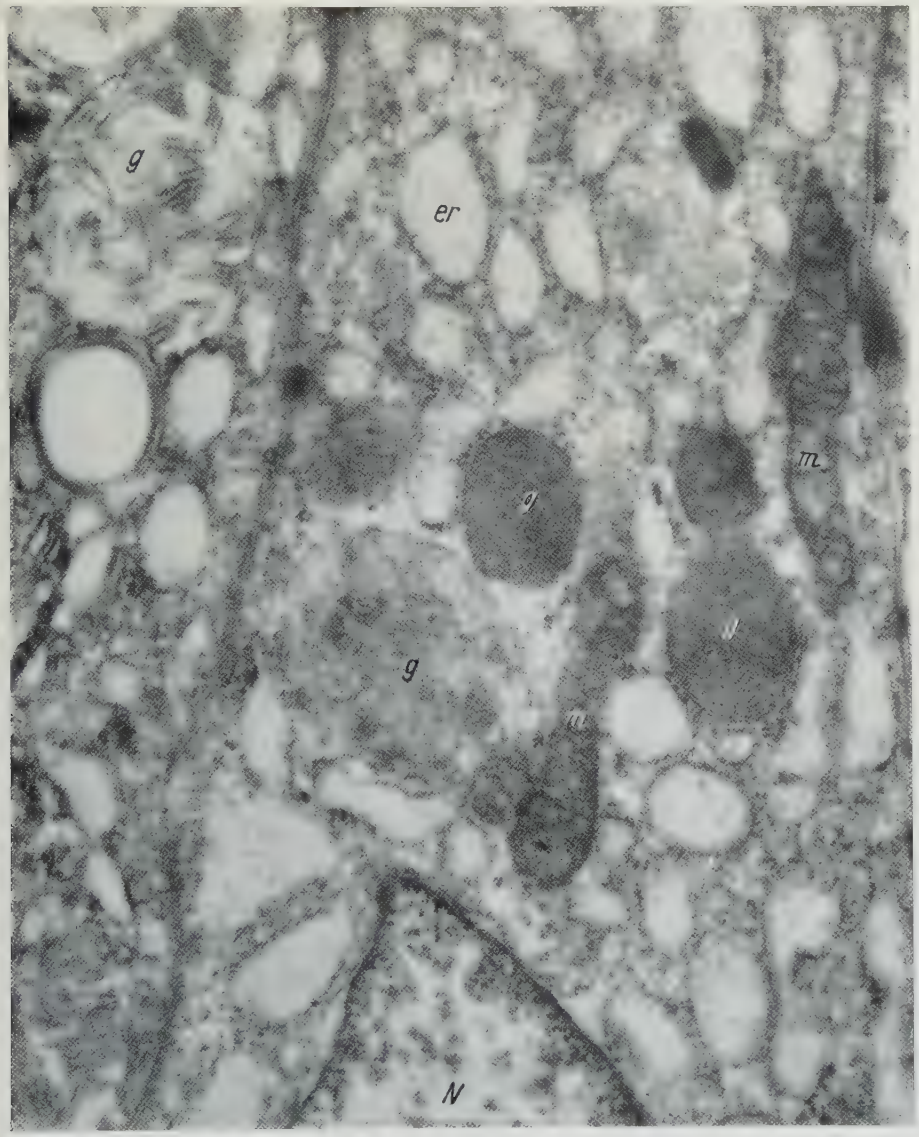


Fig. 6. Supranuclear regions of secretory cells with secretion granules (*g*) in various stages of development and slightly dilated ergastoplasmic cisternae (*er*). Note ribonucleoprotein particles. *N* nucleus; *m* mitochondria. Follicular phase. 37 000 ×

philic than that of the ciliated cells. This cytoplasmic basophilia disappears after treatment with ribonuclease and is hence indicative of the presence of ribonucleic acid, which thus is more abundant in the secretory cells. Furthermore, the secretory granules are distinctly stained by toluidine blue, but their affinity

to the dye is not influenced by the action of ribonuclease. (Extraction with the solvent for the enzyme does not markedly change the picture from the non-extracted).

2. Polysaccharides. Except for a faint staining of basement membranes and other connective tissue components, the epithelial cytoplasm is sometimes

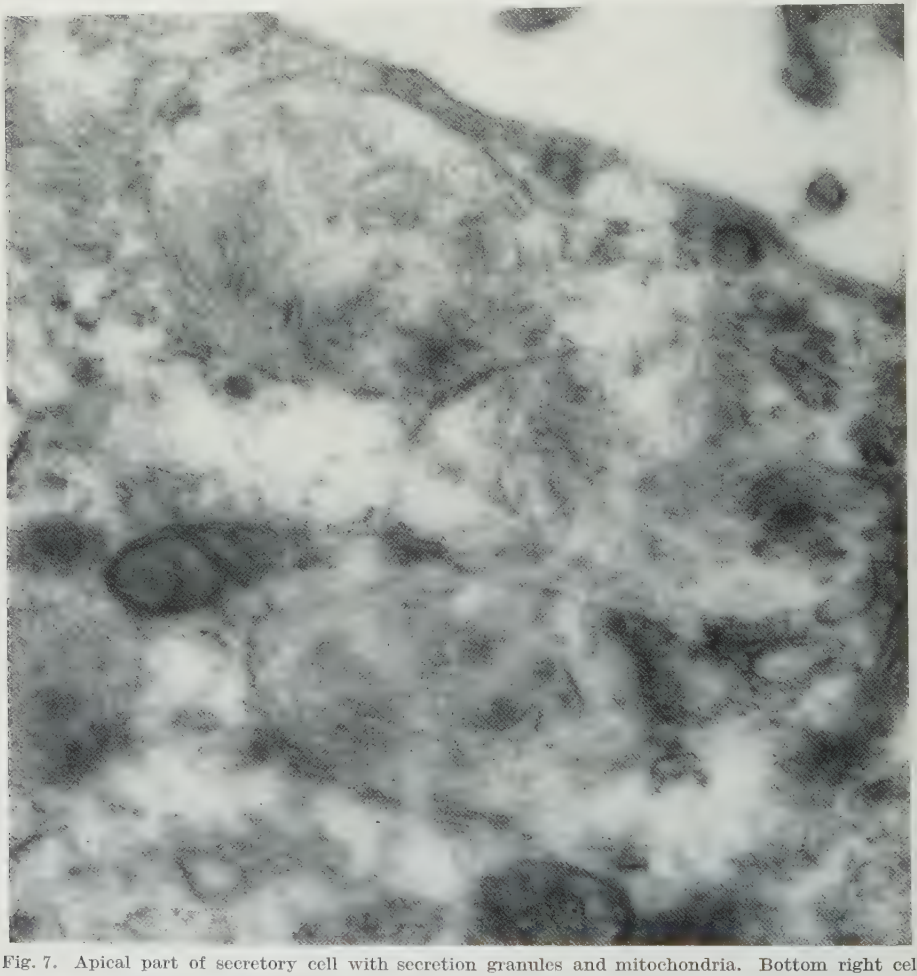


Fig. 7. Apical part of secretory cell with secretion granules and mitochondria. Bottom right cell membrane with desmosomes. Luteal phase. 66000 ×. Enlarged from Fig. 1

moderately stained by the PAS reaction. The free border of the epithelium is often stained, and the presence of microvilli is indicated by this staining. In these instances the staining is not significantly affected by diastase digestion.

The PAS-staining also shows up the secretory granules (Fig. 10) as previously known (Weeth and Herman 1952). However, our tests on their extractability gave in part results contradictory with previous reports, and the diastase digestability was found to depend upon the kind of fixation chosen (Fig. 11). After fixation in acetone or post-fixation of freeze-dried tissue in ethanol the granules are removed by the diastase. Post-fixation over paraformaldehyde often prevents their digestion. If acetic or trichloracetic acid is included in the

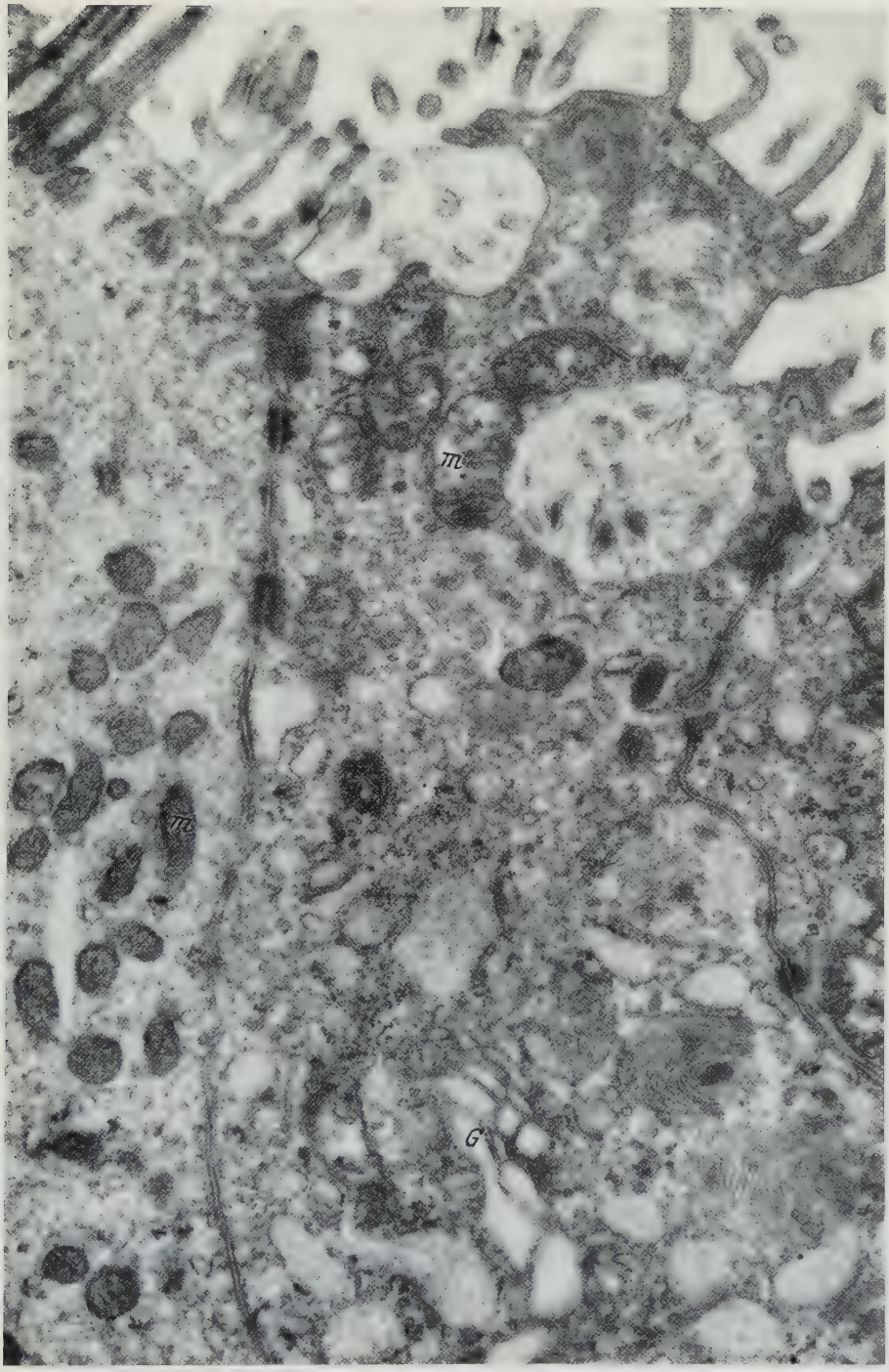


Fig. 8. Apical part of secretory cell (middle) with mitochondria (*m*), part of the Golgi apparatus (*G*) and secretion granules in different stages of development one of which is emptying its content into the tubal lumen. To the left part of a ciliated cell with small mitochondria (*m*). Note the desmosomes at the cell membranes. Follicular phase. 30 000 ×

post-fixation, however, the granules regularly appear diastase resistant. Post-fixation in mercuric chloride or Susa fixative, on the other hand, also prevents the liver glycogen to be digested.

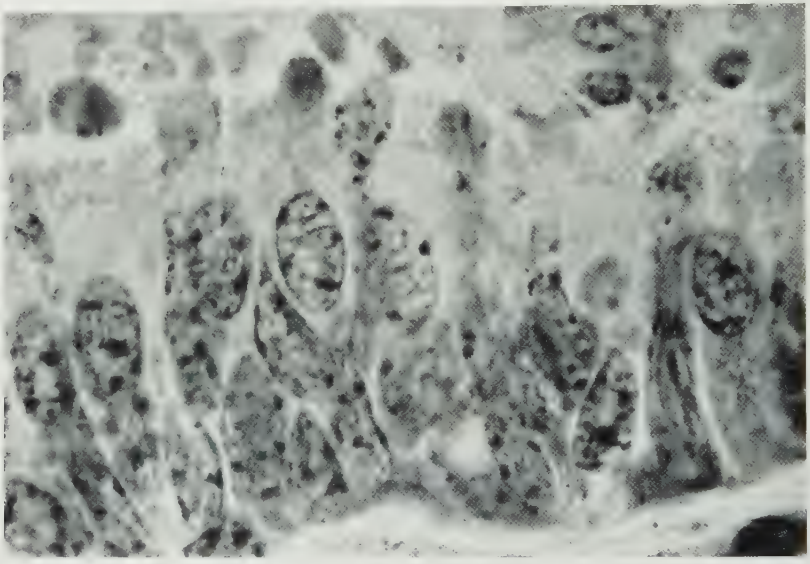


Fig. 9. Freeze-dried preparation. Early luteal phase. Toluidine blue staining. Cytoplasmic basophilia is prominent in the secretory cells, especially in their protruding parts. Secretion granules are also stained. 1560 ×

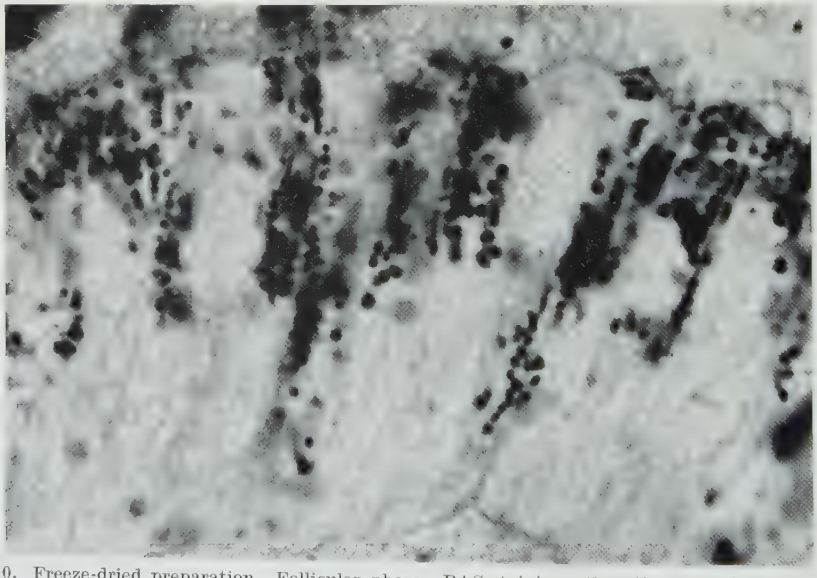


Fig. 10. Freeze-dried preparation. Follicular phase. PAS-staining. Secretion granules are stained. 1560 ×

3. Lipids. A faint staining of the epithelial cytoplasm was obtained. Further examination revealed this to be in part due to small, round or elongated stained corpuscles, which mostly seemed to represent mitochondria (Fig. 12). Larger

granules are very sparse, and, when present, mostly situated in the basal parts of the epithelium.

4. Acid phosphatase. With the method used only a weak staining of the epithelium was obtained, and the two cell-types were undistinguishable.

5. Non-specific esterase. This enzyme is rather diffusely distributed within the epithelium, but appears to predominate in the secretory cells. Sometimes

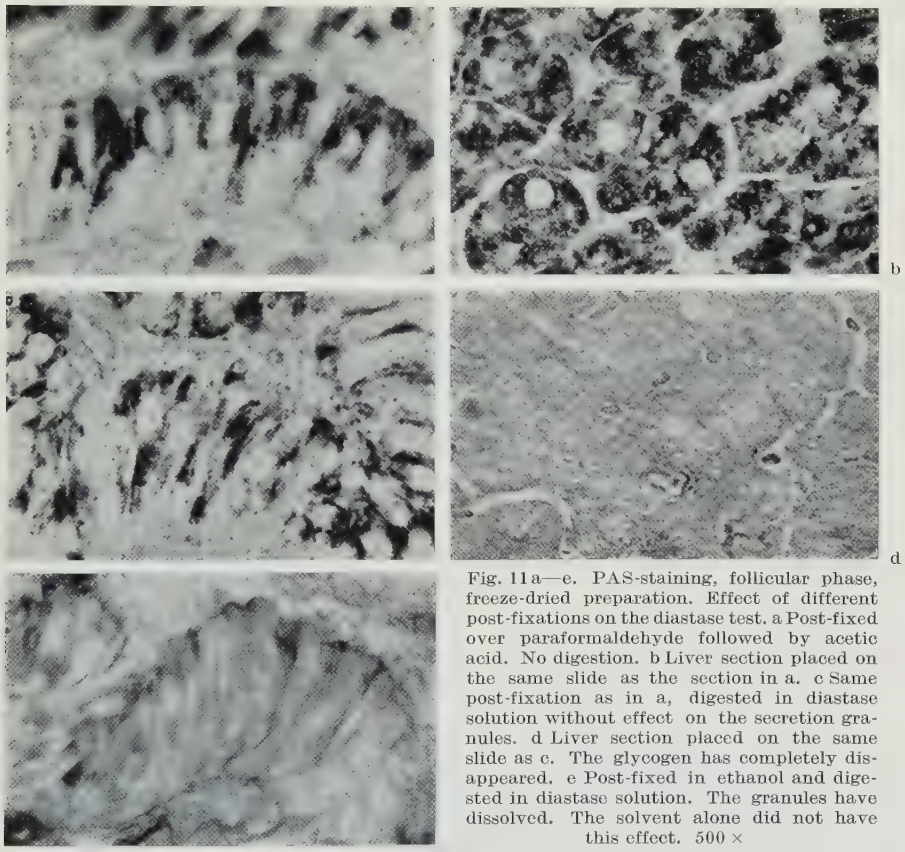


Fig. 11a—e. PAS-staining, follicular phase, freeze-dried preparation. Effect of different post-fixations on the diastase test. a Post-fixed over paraformaldehyde followed by acetic acid. No digestion. b Liver section placed on the same slide as the section in a. c Same post-fixation as in a, digested in diastase solution without effect on the secretion granules. d Liver section placed on the same slide as c. The glycogen has completely disappeared. e Post-fixed in ethanol and digested in diastase solution. The granules have dissolved. The solvent alone did not have this effect. 500 ×

stained granules are present in the apical part of the cell, but this finding was not as regular as in the human epithelium (Fredricsson 1959b). In the basal parts of the epithelium there are frequently found large dye deposits representing enzyme activity (Fig. 13). Whether these dye granules are present in the ordinary cell types of the epithelium or in wandering cells, such as white blood cells, could not be determined with certainty. The latter alternative seems rather probable, however, as the frequency of these granules is much lower than of any of the two cell types.

Discussion

The mucous membranes of the genital tract are influenced by the hormonal changes paralleling the sexual cycle. In the cow, however, the phases have a complicated course. Recently Rajakoski (1960), has shown that there are two

waves of growth of the follicles during an oestrus cycle. The luteal phase is interrupted by the first wave of follicles. The large follicle of the first wave then undergoes atresia, whereas that of the second wave bursts and ovulation occurs

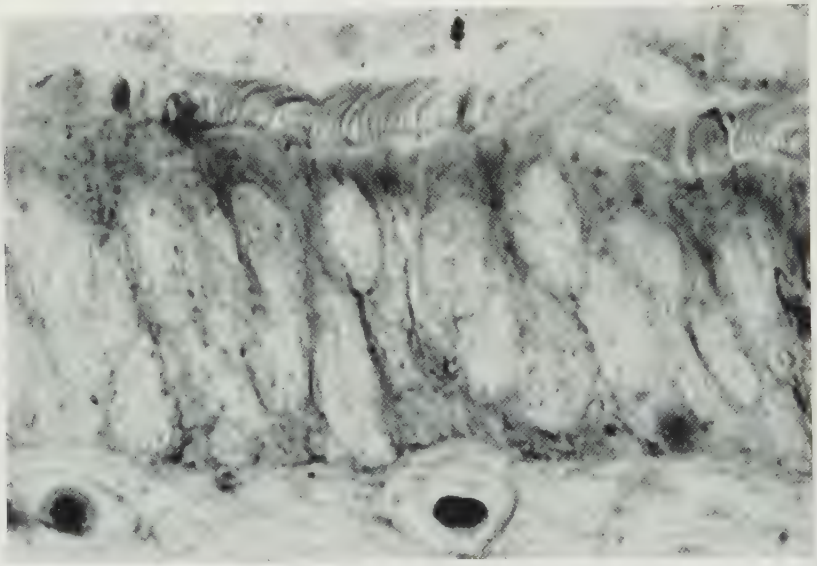


Fig. 12. Freeze-dried preparation. Early luteal phase (same as Fig. 9). Stained in methanolic solution of Sudan black B. Chiefly staining of mitochondria. 1560 ×

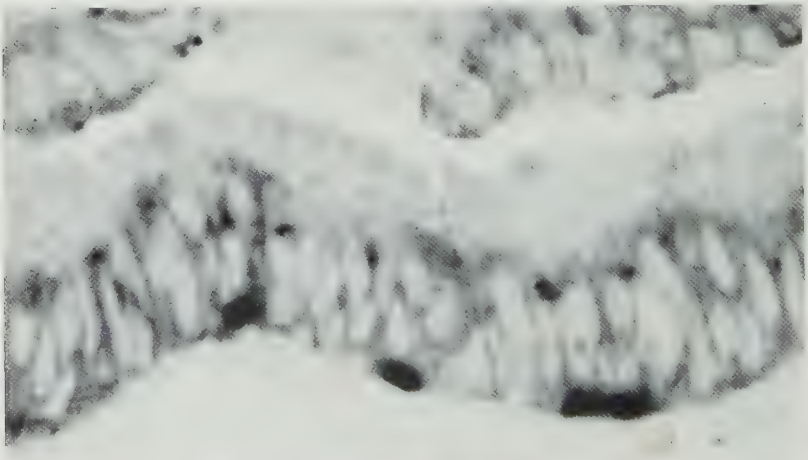


Fig. 13. Freeze-dried preparation. Luteal phase. Naphthyl acetate splitting esterase. Dye granules are found in cells near the basement membrane and also supranuclearly in secretory cells. 500 ×

after final maturation at the end of oestrus. A reliable interpretation of the hormonal influence on the tubal epithelium in cattle is therefore difficult. Furthermore, it is evident that the appearance of different cells more or less apart from each other often vary considerably, so that different functional states can be represented in a single section.

However, some features of the hormonal influence on the oviduct epithelium can be traced. The epithelium is rather compact during the luteal phase. Narrow slits are often present between the cells. Under oestrogenic influence these slits become widened, sometimes to considerable dimensions. This is probably a manifestation of the general accumulation of fluid in the tissue during the follicular phase. A corresponding feature might be the swelling of the ergastoplasmic cisternae of the secretory cells during this phase (Fig. 4). There are no accounts in the literature on such changes in oviducts from other species, but similar cytoplasmic changes have been described in liver cells after administration of oestrogen (Porte et al. 1960) and in the uterine epithelium of the rat (Mueller et al. 1958). In the human endometrium no swelling was observed (Morano et al. 1959), but Borell et al. (1959) state that the membranes of the endoplasmic reticulum show the greatest length in the follicular phase. However, species differences in the complicated sexual functions may account for this lack of consequence. It should also be mentioned that no such changes are evident in the ciliated cells of the bovine oviduct.

The histochemical findings could not be correlated to the different phases of the sexual cycle.

The secretion process is only slightly influenced by the phases of the cycle. In the bovine oviduct an accumulation of secretory granules was observed during the follicular phase but the difference as to the luteal phase was but slight. The granules are comparable in size with those of the rat (Borell et al. 1959) and rabbit (Borell et al. 1956; Nilsson 1958 and Nilsson and Rutberg 1961) but they seem to have a more characteristic structure and a more marked cycle of development. Appearing first as small dense granules they grow larger and less dense. Membranes appear which change to a needle like shape. This may simply signify a progressive hydration process, and the structures within the granules may then be fixation artefacts related to the myelin figures of Stoeckenius (1959).

Histochemically the granules are defined as basophilic and PAS-reactive. Previously they have been claimed to contain glycogen (Weeth and Herman 1952), but the diastase test is dependant on the fixative used as shown in this paper and previously demonstrated by Björkman (1952). By fixing the tissue appropriately, the granules become diastase resistant. Of course diastase resistance does not exclude the presence of glycogen together with some glycoprotein but this seems less probable as glycogen has an appearance in the electron microscopic picture (Karrer and Cox 1960; Revel et al. 1960) that has not been found in the present material.

The discharge of secretory granules from the cell is probably represented in Fig. 8. The membrane of the granule has joined the cell membrane and the granule is then emptied of its content without the cytoplasm being brought in contact with the extracellular space, which is in accordance with Bennett's (1956) theory of membrane flow.

The ciliated and secretory cells are of approximately the same size forming together a columnar epithelium. However, they present many conspicuous structural differences. In addition to the differences at the epithelial surface (Björkman and Fredricsson 1960), differences between e.g. nuclei, mitochondria,

and ergastoplasm of the two kinds of cells exist. Histochemical tests for basophilia, for alkaline phosphatase, and the PAS reaction reveal equally apparent differences. The secretory cells exhibit variations in connection to the sexual cycle and the secretory activity. However, intermediate forms between ciliated and secretory cells have never been convincingly described. Thus, the old concept of transition from one type of cell to another is refuted in this work. In an experimental study Fredricsson (1959a) also disproved the concept.

Summary

The epithelium of the bovine oviduct was studied with respect to its ultrastructural organization and histochemical features.

The ciliated cells seem to undergo no changes during the sexual cycle. The nucleus is regular, the mitochondria are small and frequent. Particles resembling lysosomes are present. Except for the free surface, containing alkaline phosphatase, these cells do not present any particular histochemical characteristics.

The secretory cells contain more ribonucleic acid than the ciliated cells, and the endoplasmic reticulum is better developed. This also shows changes correlated with the sexual phases, thus the cisternae are much larger during the follicular phase than during the luteal phase. The nucleus is deeply fissured, the cisternae of the ergastoplasm dipping into these fissures. The mitochondria are larger and less frequent than in the ciliated cells. Secretion granules are frequently present. They are basophilic and periodic acid-Schiff reactive. They seem not to contain glycogen. The granules undergo characteristic changes and are subsequently discharged. This process is not paralleled by any changes in the histochemical reactions studied.

Tests for the demonstration of lipids, non-specific esterase, and acid phosphatase did not give information that could be correlated to the ultrastructural organization.

References

Bennett, H. S.: The concept of membrane flow and membrane vesiculation as mechanism for active transport and ion pumping. J. biophys. biochem. Cytol. Suppl. **2**, 99—103 (1956).

Björkman, N.: On the polysaccharide content of certain epithelia in contact with fluids. Acta anat. (Basel) **16**, 191—202 (1952).

—, and B. Fredricsson: The ultrastructural organization and the alkaline phosphatase activity of the epithelial surface of the bovine Fallopian tube. Z. Zellforsch. **51**, 589—596 (1960).

Borell, U., K.-H. Gustavsson, O. Nilsson and A. Westman: The structure of the epithelium lining the Fallopian tube of the rat in oestrus. Acta obstet. gynec. scand. **38**, 203—208 (1959).

— O. Nilsson, J. Wersäll and A. Westman: Electron-microscope studies of the epithelium of the rabbit Fallopian tube under different hormonal influences. Acta obstet. gynec. scand. **35**, 35—41 (1956).

— — and A. Westman: The cyclical changes occurring in the epithelium lining the endometrial glands. Acta obstet. gynec. scand. **38**, 364—377 (1959).

Brachet, J.: The use of basic dyes and ribonuclease for the cytochemical detection of ribonucleic acid. Quart. J. micr. Sci. **94**, 1—10 (1953).

Fredricsson, B.: Histochemical studies on the epithelium in the human fallopian tubes and comparison between different animal species. Ark. Zool. (Stockh.), Ser. II **11**, 110—111 (1957).

Fredricsson B.: Preservation of the activities of alkaline phosphatase and naphthyl acetate splitting esterase during freeze-drying, embedding in polyethylene glycol, and post-fixation. Acta histochem. (Jena) **6**, 165—173 (1958).

— Proliferation of rabbit oviduct epithelium after estrogenic stimulation, with reference to the relationship between ciliated and secretory cells. Acta morph. neerl.-scand. **2**, 193—202 (1959a).

— Histochemical observations on the epithelium of human Fallopian tubes. Acta obstet. gynec. scand. **38**, 109—134 (1959b).

Graumann, W., u. W. Clauss: Untersuchungen zum cytochemischen Glykogennachweis III. Versuche zum Diastasetest. Histochemie **1**, 241—246 (1959).

Hadek, R.: The secretory process in the sheep's oviduct. Anat. Rec. **121**, 187—205 (1955).

Holt, S. J., and R. F. J. Withers: Studies in enzyme cytochemistry. V. An appraisal of indigogenic reactions for esterase localization. Proc. roy. Soc. B **148**, 520—532 (1958).

Karrer, H. E., and J. Cox: Electron-microscopic study of glycogen in chick embryo liver. J. ultrastruct. Res. **4**, 191—212 (1960).

Lillie, R. D., and J. Greco: Malt diastase and ptyalin in place of saliva in the identification of glycogen. Stain Technol. **22**, 67—70 (1947).

Meier, W.: Untersuchungen zur Theorie der Fettfärbung. Z. wiss. Mikr. **64**, 193—208 (1959).

Morano, E., S. Sirtori and G. Vecchietti: Ultrastruttura dell'endometrio umano. Tumori **45**, 1—12 (1959).

Mowry, R. W., J. B. Longley and R. C. Milligan: Histochemical demonstration of intravenously injected dextran in kidney and liver of the mouse. J. Lab. clin. Med. **39**, 211—217 (1952).

Mueller, G. C., A. M. Herranen and K. F. Jervell: Studies on the mechanism of action of estrogens. Recent Progr. Hormone Res. **14**, 95—129 (1958).

Nilsson, O.: Electron microscopy of the Fallopian tube epithelium of rabbits in oestrus. Exp. Cell Res. **14**, 341—354 (1958).

—, and U. Rutberg: Ultrastructure of secretory granules in postovulatory rabbit oviduct. Exp. Cell Res. **21**, 622—625 (1961).

Pearse, A. G. E.: Histochemistry, theoretical and applied, 2nd edit. London: J. & A. Churchill 1960.

Porte, A., J. P. Zahnd et J. Clavert: Apparition de structures ergastoplasmatiques sous l'action de la folliculine dans la cellule hepatique de certains vertebres inferieurs. Report at the European Regional Conference on Electron Microscopy, Delft, 1960.

Rajakoski, E.: The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical and left-right variations. Acta endocr. (Kbh.) 34, Suppl. **52**, 1—68 (1960).

Revel, J. P., L. Napolitano and D. W. Fawcett: Identification of glycogen in electron micrographs of thin tissue sections. J. biophys. biochem. Cytol. **8**, 575—589 (1960).

Serra, J. A.: Histochemical tests for proteins and amino acids; the characterization of basic proteins. Stain Technol. **21**, 5—18 (1946).

Stoeckenius, W.: An electron microscope study of myelin figures. J. biophys. biochem. Cytol. **5**, 491—500 (1959).

Weeth, H. J., and H. A. Herman: A histological and histochemical study of the bovine oviducts, uterus and placenta. Res. Bull. Missouri agric. Exp. Stat. **501**, 1—54 (1952).

Dr. Nils Björkman, Department of Anatomy and Histology,
Laboratory of Electron Microscopy, Veterinärhögskolan, Stockholm 51, Sweden

Dr. Bengt Fredricsson,
Department of Histology, Karolinska Institutet, Stockholm 60, Sweden

Zeitschrift für Zellforschung 55, 514—555 (1961)

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Münster (Westf.)
(Direktor: Prof. Dr. Dr. H. Becher)

MORPHOLOGISCH-EXPERIMENTELLER BEITRAG ZUM LICHTMIKROSKOPISCHEN BAU DES VEGETATIVEN NERVENSYSTEMS

II. Mitteilung*

DIE ENDIGUNGSWEISE DER POSTGANGLIONÄREN NERVENFASERN

Von

H. Knoche

Mit 17 Textabbildungen

(Eingegangen am 12. Mai 1961)

Einleitung

Die Endigungsformen präganglionärer Nervenfasern (Endringe, Ösen und Kolben) lassen sich nicht am Ende der postganglionären, sympathischen Nervenfasern erkennen. Die postganglionären Nervenfasern entwickeln in Nähe der Erfolgszellen die aus einem kernhaltigen Plasmanetz, Neurofibrillen und marklosen Nervenfasern „zusammengesetzte vegetative Endformation". Während Jabonero (1953) in Übereinstimmung mit eigenen Ergebnissen die Stöhrsche Anschauung einer syncytialen Bauweise der interneuronalen Synapse ablehnt, berichtet der Autor von einem in der Peripherie gelegenen „distalen Syncytium". Danach gliedern sich die efferenten vegetativen Bahnen in drei Systeme: 1. Neuronaler Aufbau der sympathischen Ganglien. 2. Ebenso wie den präganglionären Nervenfasern fehlt den Nervenfasern, welche die innere glatte Augenmuskulatur versorgen, ein syncytiales Endnetz. Die vegetativen Nervenfasern finden hier wie im Nebennierenmark mit kleinen Ringen und Ösen am oder im Erfolgsplasma ihr Ende. 3. Die meisten vegetativen, efferenten Nervenbahnen bilden ein aus parallel angeordneten oder netzig verknüpften Fasern oder Fibrillen zusammengesetztes distales, plasmatisches Syncytium. Das kernhaltige Syncytium enthält nach Jabonero (1961) Nervenfasern, Fibrillen, Granula und Vakuolen verschiedener Größe. Nach Auffassung des Autors verkörpert das distale Syncytium ein System eigener Art, dessen Nervenfasern oder Fibrillen von den postganglionären Nervenfasern völlig unabhängig sind. Infolgedessen sind die Fasern des distalen Syncytiums nicht als Fortsetzung der postganglionären Nervenfasern aufzufassen; vielmehr sollen die postganglionären Fasern am oder im nervösen Syncytium endigen, dort nervöse Impulse freisetzen, die ihrerseits eine Reaktion des Syncytiums, d. h. die Freigabe eines Überträgerstoffes hervorrufen. Der Mediatstoff soll sich im Gewebe ausbreiten und es beeinflussen. Somit würde eine Beeinflussung des Erfolgsgewebes durch die sekretorische Tätigkeit des Endsyncytiums als einer „Synapse auf Distanz" stattfinden. Daß bei Jaboneros Überlegungen vielfach hypothetische Forderungen den morphologischen Befund überdecken und der Autor selbst mit Strukturen arbeitet, die Fixierungsprodukte darstellen oder nicht nachgewiesen sind, soll später berücksichtigt werden. Aus den zahlreichen Arbeiten Jaboneros geht jedoch der Nach-

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

weis eines nervösen Faser- oder Fibrillennetzes hervor, das in einem kernhaltigen Syncytium liegt. Eine Verbindung des Endsyncytiums mit dem nicht nervösen Erfolgsplasma findet nach Jabonero (1961) nicht statt.

Nach Boeke (1933—1951) existiert ein sympathischer Grundplexus (marklose, netzartig miteinander verwobene Neurofibrillenzüge, Schwannsche Kerne, keine Zellgrenzen) und daran anschließend ein periterminales Netzwerk (ein halb plasmatisches, halb neurofibrilläres mit interstitiellen Zellen versehenes Organ), das im Plasma der Erfolgszellen liegt und im Gegensatz zu der leitenden Funktion des Grundplexus die nervösen Impulse auf das Erfolgsplasma überträgt.

Nach Stöhr jr. (1932—1960) und Reiser (1932—1959) entsteht an der funktionellen Verbindungsstelle der vegetativen Nervenfasern mit dem nicht nervösen Plasma ebenso wie in den Ganglien das „Terminalreticulum", das sich in die Erfolgszellen einsenken und mit ihnen verschmelzen soll. Das ubiquitäre faserige oder fibrilläre Netz liegt daher entweder im Schwannschen Leitgewebe, im Plasma sog. interstitieller Zellen oder im Plasma der Erfolgszellen. Die interstitiellen Zellen (Gerlach 1876, Cajal 1894) befinden sich relativ oft an den Knotenpunkten des Nervennetzes, sollen nach Stöhr eine Ähnlichkeit mit kleinen Nervenzellen haben und dem Endnetz eine selbständige Arbeitsweise verleihen.

Auch Feyrter (1951) berichtet von einem vegetativen Endnetz und bringt aber mit sog. „intercalären Zellen" einen weiteren Unsicherheitsfaktor in die Diskussion.

Es ist vielfach versucht worden, das Terminalreticulum als bindegewebige Formation hinzustellen (Nonidez 1937—1944, Hillarp 1946, Feindel, Sinclair und Weddell 1947, Millen 1948, Kirsche 1955—1960 u. a.). Diese Versuche müssen als gescheitert angesehen werden, da man die Elemente des Terminalreticulums in kontinuierlicher Verbindung mit Nervenfasern beobachten kann und das Endnetz dadurch ein echtes nervöses Organ verkörpert, das auch auf Durchschneidungen postganglionärer Nervenfasern reagiert. Die Ursache der mehr oder weniger stark voneinander abweichenden Befunde und Interpretationen ist u. a. in der Anwendung verschiedener histologischer Techniken zu suchen. Auch wird von den meisten Autoren gar nicht versucht, zu einer einheitlichen Beurteilung der Morphologie des vegetativen Nervensystems zu kommen. Jeder, der sich mit dem Bau des vegetativen Nervensystems beschäftigt, beharrt auf seiner, manchmal nur durch geringfügige Nuancen von den Ansichten und Befunden anderer Autoren sich unterscheidenden Meinung. Eine solche allzu einseitige Betrachtungsweise steht einer exakten Bearbeitung des vegetativen Nervensystems im Wege. So stützen sich Stöhr und Reiser (1959) seit 30 Jahren allein auf die mit der Bielschowsky-Methode erzielten Resultate, die auch nach meinen Erfahrungen die Faserelemente des Nervensystems zweifellos sehr gut hervortreten läßt, die plasmatische Substanz der vegetativen Endformation jedoch nur gelegentlich darstellt. Dennoch gelang Stöhr (1957) teilweise eine gute Imprägnation des Plasmas von nervösen Schlingenterritorien, die zum vegetativen Endnetz gehören. Auch Jabonero (1948) hat anfangs seine Befunde vorwiegend durch die Silbercarbonatmethode gewonnen, benutzt jetzt aber verschiedene histologische Techniken zum besseren Nachweis der Einzelelemente in der vegetativen, nervösen Peripherie In den letzten Jahren habe ich die Bielschowsky-Methode, die Silberimprägnationen nach Feyrter, nach Sunder-

Plassmann, eine solche in eigener Modifikation, die Silbercarbonatmethode nach Jabonero und Feyrters native Einschlußfärbung mit Ehrlichschem Hämatoxylin durchgeführt. Obwohl die Einführung der Silbercarbonatmethode nach Jabonero (1948) eine wesentliche Bereicherung der neurohistologischen Technik bedeutet, sei dem Autor die Anwendung der genannten Verfahren empfohlen. Bei gleichzeitiger Verwendung mehrerer histologischer Techniken wird auch die Diskussion, wem die beste Methode zur Darstellung des Nervengewebes zur Verfügung steht, überflüssig.

Nach den Berichten und Abbildungen der meisten Autoren und nach eigenen Befunden (Knoche 1950—1958) existiert am Ende der vegetativen Nervenbahn ein System markloser Nervenfasern und Fibrillen, das mit länglichen und teilweise rundlichen Kernen versehen ist oder — mit anderen Worten — in einem mit länglichen und wenigen rundlichen Kernen ausgestatteten Plasmanetz granulärer Beschaffenheit liegt. Irgendwelche gut abgrenzbare Endigungen sind nicht erkennbar. Als Neurofibrillen sollen in Übereinstimmung mit Jabonero (1960) im Größenbereich von 1 μ bis zur Grenze des Auflösungsvermögens des Lichtmikroskops sichtbare feinste faserige Strukturen bezeichnet werden, die in Nervenzellen, ihren Fortsätzen und damit im Gebiet der vegetativen Endformation zu beobachten sind. Es sei weiter betont, daß die Resultate und Deutungen Stöhrs (1957) die Erforschung des vegetativen Nervensystems außerordentlich schnell und intensiv in Gang gebracht haben. Schon kurze Zeit nach der Beschreibung des Terminalreticulums durch Stöhr (1932) und Reiser (1932) und des periterminalen Netzwerkes durch Boeke (1932) konnten die *Befunde* der genannten Autoren bei zahlreichen Untersuchungen bestätigt werden, während man sich zunehmend gegen die Deutungen ihrer Resultate wandte. Dem aufmerksamen Beobachter fallen tatsächlich erhebliche Unterschiede zwischen den *Resultaten* und ihrer *Auslegung* durch die erwähnten Autoren auf. Man wird jedoch Stöhrs Untersuchungen keinesfalls gerecht, wenn man seine Befunde und Anschauungen in Bausch und Bogen ablehnt. Es ist daher u. a. das Ziel des vorliegenden Berichtes, in einer allgemeinen Betrachtung festzustellen, welche Deutungen die von den einzelnen Autoren erzielten Resultate zulassen. Es soll außerdem versucht werden, die Frage nach einer Netzbildung oder einer unabhängigen Lage der Fasern der vegetativen Endformation und ihres Trägerplasmas sowie die Frage einer lichtmikroskopisch nachweisbaren Kontinuität oder Berührung zwischen vegetativem Nervengewebe und nicht nervösem Erfolgsplasma zu beantworten. — Material und Methodik siehe I. Mitteilung[1].

Befunde

Im Folgenden werde ich das Ende der vegetativen Nervenbahn als vegetative Endformation und nicht als Terminalreticulum bezeichnen, da Stöhr auch ein aus den Infundibularnerven des hypothalamo-hypophysären Systems hervorgegangenes Netz dem Terminalreticulum eingliedert. Ebenso machen andere, morphologisch entscheidende Gründe eine Aufgabe der Bezeichnung „Terminalreticulum" erforderlich.

Wie bereits erwähnt, liegt das Ende der vegetativen Nervenbahn an ihrer funktionellen Verknüpfungsstelle mit nicht nervösem Erfolgsplasma keineswegs

[1] Z. Zellforsch. 54, S. 209 (1961).

in Form von Ringen, Kolben oder Endösen wie in sympathischen Ganglien, sondern als ein geschlossenes System vor. Die vegetative Endformation setzt sich aus sehr feinkalibrigen, marklosen Nervenfasern und Neurofibrillen zusammen,

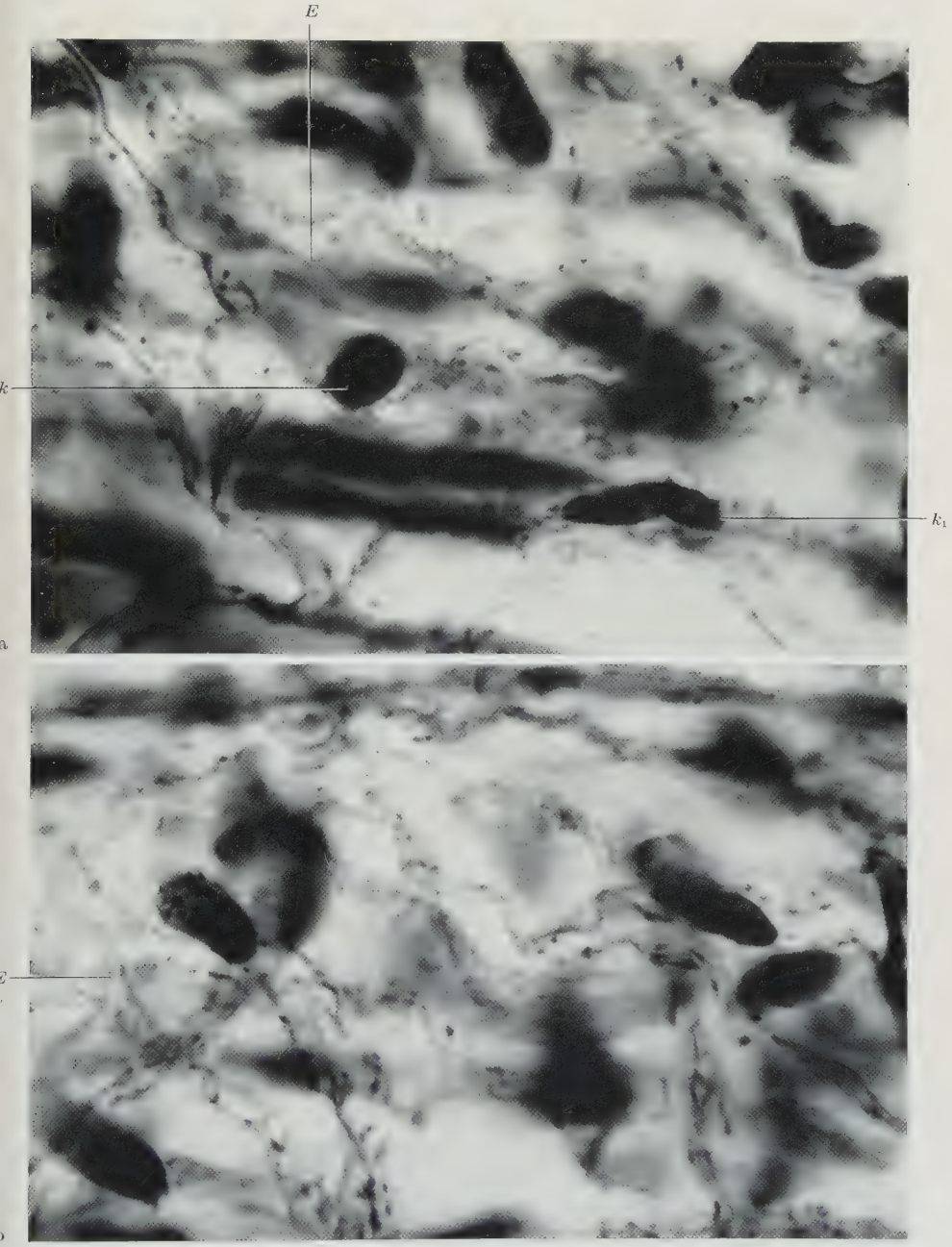


Abb. 1a u. b. Vegetative Endformation an der Muskulatur und in der Adventitia der A. uterina des Menschen. Bielschowsky-Methode. Etwa 1120mal vergrößert, auf 19/20 verkleinert. *E* vegetative Endformation, *k* rundlicher Kern, k_1 länglicher Kern innerhalb der vegetativen Endformation

die zu Strängen oder flächenhaften Netzen geformt sein können. Die Fasern und Fibrillen zeigen oft in unregelmäßigen Abständen kleine kugelige oder spindelförmige Verdickungen und vakuoläre Bildungen. Andererseits sind in der vegetativen Endformation vollkommen glatte Fasern enthalten. Längliche, vornehmlich in den Bündeln gelegene Kerne wechseln mit solchen rundlich-ovaler Form ab, die hauptsächlich an Verknüpfungs- oder Verteilungsstellen der Endformation liegen. Die Frage nach der Ursache eines vorwiegend strangförmigen, andererseits aber flächenhaften Charakters des Endnetzes läßt sich vorläufig nicht beant-

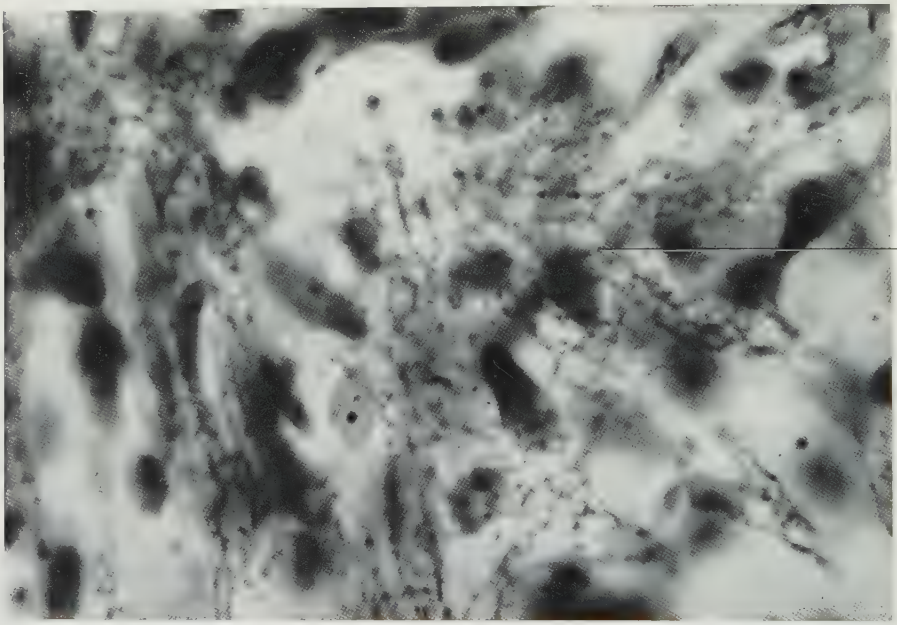


Abb. 2. Vegetative Endformation in der Schleimhaut des Proc. vermiformis. Mensch. Bielschowsky-Feyrter-Methode. Etwa 1000mal vergrößert, auf 19/20 verkleinert. *E* vegetative Endformation

worten. Stöhr (1957) glaubt an einen formativen Einfluß des Erfolgsgewebes auf die vegetative Endformation. Die Endformation der Abb. 1a breitet sich auf der Muscularis der A. uterina aus, die der Abb. 1b in der Adventitia der gleichen Arterie. In beiden Fällen handelt es sich um das Endgebiet vegetativer Nervenfasern und doch wird in Abb. 1b eine mehr strangförmige Anordnung der Fasern bemerkbar, während sich in Abb. 1a außer zarten Faser- und Fibrillenbündeln schon ein flächenhaftes Netz andeutet. Das der Schleimhaut des Proc. vermiformis entnommene vegetative Endnetz (Abb. 2) gibt sich als ein relativ breit angelegtes, sehr feinmaschiges Netz zu erkennen. Die Fasern und Fibrillen der vegetativen Endformation lassen sich über weite Strecken in parallelem oder sich überkreuzendem Verlauf ohne jede Anastomosenbildung beobachten. Stellenweise sind jedoch Verbindungen zwischen den Fasern oder Fibrillen feststellbar. Auch Jabonero (1958) gibt zu, daß echte Anastomosen zwischen den Neurofibrillen der vegetativen Endformation bestehen. Ebenso hat Hillarp (1940) in Methylenblaupräparaten Verbindungen von Neurofibrillen und somit ein nervöses Netz nachgewiesen. Der Netzcharakter ist nach meinen Befunden

keineswegs immer vorherrschend und somit entscheidend für den prinzipiellen Aufbau der vegetativen Endformation. Ebenso finden sich Nervenfasern und Fibrillen, die den gleichen Durchmesser wie die netzartig verknüpften Elemente haben, in völlig isolierter Anordnung ohne jede Netzbildung. Stöhr (1957) stützt seine diesbezügliche Anschauung einer syncytialen Bauweise des vegetativen Nervensystems auf ein konstant auftretendes Fibrillen- oder Fasernetz. Wenn auch die Befunde des Autors nicht angezweifelt werden sollen, so muß doch auf das häufige Fehlen jeglicher Anastomosen im vegetativen Endgebiet aufmerksam gemacht werden. Diese isoliert einherziehenden, der vegetativen Endformation einzugliedernden Fasern und Fibrillen besitzen allerdings keine lichtmikroskopisch nachweisbaren Endigungstypen. Im Thymusparenchym habe ich sehr feinkalibrige, marklose Nervenfasern beobachtet, die bei stärkster lichtmikroskopischer Vergrößerung gerade noch zu erkennen waren und keine Netzbildung zeigten. Auch Stöhr (1957) spricht in seinen zahlreichen Untersuchungen von sehr dünnen, nicht netzartig verknüpften Nervenfasern. Da der Verfasser jedoch an ihnen keine Endigungsformen beobachten konnte, glaubt er eine Netzbildung annehmen zu müssen. Wenn Stöhr einmal einen von vielen Autoren bestätigten Netzcharakter der vegetativen Endformation aufgedeckt hat, so vernachlässigt er bei seinen Überlegungen die Tatsache einer sicheren Existenz von feinsten marklosen Nervenfasern und Fibrillen ohne Verknüpfungsstellen. Meines Erachtens darf man aber dem erwähnten, aus unabhängig voneinander verlaufenden Fasern und Fibrillen bestehenden System keinen Netzcharakter zusprechen, nur weil besondere Endigungstypen fehlen. Nervenfasern und Neurofibrillen in der Größenordnung der Elemente des Terminalreticulums (Stöhr 1957, Reiser 1959), des Grundplexus und periterminalen Netzwerkes (Boeke 1951), des distalen Syncytiums (Jabonero 1961) und des vegetativen Endnetzes (Feyrter) breiten sich entweder unabhängig voneinander aus oder entwickeln Anastomosen. Wenn einerseits lichtmikroskopische Untersuchungen in Silberpräparaten äußerst feinkalibrige Nervenfasern und Fibrillen ohne jegliche Querverbindungen, andererseits nervöse Netze aufzeigen, so muß man folgende Gründe für die unterschiedliche Gestalt der vegetativen Endformation erörtern: Die verschiedene Bauweise der vegetativen Endformation (isolierte oder netzartig verknüpfte Nervenfasern) ist möglicherweise als Ausdruck abweichender Funktionszustände des vegetativen Nervensystems zu deuten. Weiter kann bei einer sehr engen Lagerung der Neurofibrillen und Fasern eine Netzbildung als Folge der Fixierung und Imprägnation nur vorgetäuscht sein. Weber (1949) behauptet, daß das periterminale Netzwerk (Boeke 1933) und das Terminalreticulum (Stöhr 1950, Reiser 1938) nur infolge einer zu hohen Formalinkonzentration in der von den Autoren gezeigten Weise auftreten. Außerdem bleibt zu erwägen, ob ein Nervennetz nur durch eine gegenseitige sehr dichte Anlagerung von Nervenfasern oder Fibrillen entsteht und somit lichtmikroskopische Vergrößerungen zur Entscheidung, ob ein wirkliches Netz vorliegt oder nicht, nicht ausreichen. Es besteht außerdem die Möglichkeit, daß die scheinbaren Verknüpfungsstellen auf das Vorkommen interaxonaler Synapsen hinweisen. Die vegetative Endformation aus der Appendixschleimhaut zeigt deutlich eine netzartige Ausbreitung von Nervenfasern, während in Abb. 3 auch frei verlaufende, keine Anastomosen eingehende Fasern und Fibrillen vorhanden sind. Bei Berück-

sichtigung der in Abb. 1—3 wiedergegebenen Befunde ist es schwer, lediglich eine netzartige oder nur eine unabhängige Anordnung der Nervenfasern zu vertreten. Daher ist es erforderlich, auf Grund lichtmikroskopischer Resultate die vegetative Endformation als ein aus netzartig und unabhängig voneinander verlaufenden Nervenfasern und Fibrillen zusammengesetztes System zu bezeichnen, an dem sich vorerst mit den heutigen Imprägnations- und Färbeverfahren keine spezifischen Endigungstypen nachweisen lassen. Ob tatsächlich eine Netzbildung vorliegen kann oder ob aus den erwähnten Gründen ein Nervennetz nur vorgetäuscht wird, kann besser durch elektronen- als durch lichtmikroskopische Befunde geklärt werden.

Während man an den meisten nervösen Systemen gut abgrenzbare Endigungen in Gestalt von Ringen, Ösen, Kolben, Reticularen, Endplättchen oder sensiblen Endkörperchen kennt, geben hierfür lichtmikroskopische Untersuchungen an der Verknüpfungsstelle des vegetativen Nervensystems mit nicht nervösen Zellen keine befriedigenden Resultate. Diese auch aus funktionellen Gründen nicht ausreichend erklärbare „morphologische Lücke" verspürt ebenfalls Jabonero (1956), der daher zwischen postganglionären Nervenfasern und Erfolgsplasma ein „distales Syncytium" als Endformation einschiebt. Danach sollen die postganglionären Nervenfasern am oder im distalen Syncytium endigen, es erregen und zur Abgabe eines Stoffes veranlassen. Bisher war es allerdings selbst Jabonero nicht möglich, die von ihm geforderten postganglionären Nervenendigungen am Syncytium darzustellen. Nach Jabonero hat man sich die vegetative Endformation, die vom Autor auch „Synapse auf Distanz", „distales, nervöses Syncytium" oder „System der Protoplasmafasern" genannt wird, als einen in sich geschlossenen Apparat vorzustellen. Die Faserelemente der vegetativen Endformation stellen danach nicht das Ende postganglionärer Nervenfasern dar, sondern müssen nach den hypothetischen Darlegungen des Verfassers als Differenzierungsprodukte der Zellen der vegetativen Endformation angesehen werden. Somit würde die vegetative Endformation ein weiteres Neuron verkörpern, das von den postganglionären Nervenfasern innerviert wird. Diese Ansicht geht aus den zahlreichen Veröffentlichungen Jaboneros hervor, der diese Meinung allerdings wahrscheinlich wegen Mangels an morphologisch einwandfreien Befunden nicht so konsequent ausspricht. Zwischen vegetativer Endformation und nicht nervösen Erfolgszellen bestehen rein nachbarliche Beziehungen, und die vegetative Endformation nähme keinen oder nur selten Kontakt zum Erfolgsplasma auf. Die Entfernung zwischen Erfolgszelle und Nervenendformation soll sogar erheblich groß sein, was der Autor offensichtlich mit der Bezeichnung „Synapse auf Distanz" ausdrücken will. Hierin läßt sich Jabonero (1961) nicht in jeder Hinsicht zustimmen. Obwohl man keineswegs eine plasmatische Verschmelzung von Nervengewebe mit nicht nervösem Erfolgsplasma sicher nachweisen kann, liegen doch Teile der vegetativen Endformation den Erfolgszellen sehr dicht an. Aus Abb. 1 geht deutlich eine Anlagerung vegetativer Nervenfasern und Fibrillen an glatte Muskelzellen der A. uterina hervor. Ebensowenig wie Jabonero (1961) an eine direkte Innervation der Erfolgszellen glaubt und eine nervöse Versorgung in Bausch und Bogen annimmt, so bestreitet er ein Eindringen vegetativer Nervenfasern in die Media von Arterien. Es ist richtig, wie Jabonero (1953) behauptet, daß sich die vegetative Endformation hauptsächlich an der Grenze der Adventitia

zur Media erstreckt (Abb. 1b). Außerdem erreichen aber von hier aus Anteile der vegetativen Endformation tiefere Bezirke der Media (Abb. 1a). Auch VAN CAMPENHOUT (1956) beobachtete ein Eindringen markloser Nervenfasern aus einem subadventitiellen Plexus in die äußeren Mediaschichten. Wahrscheinlich

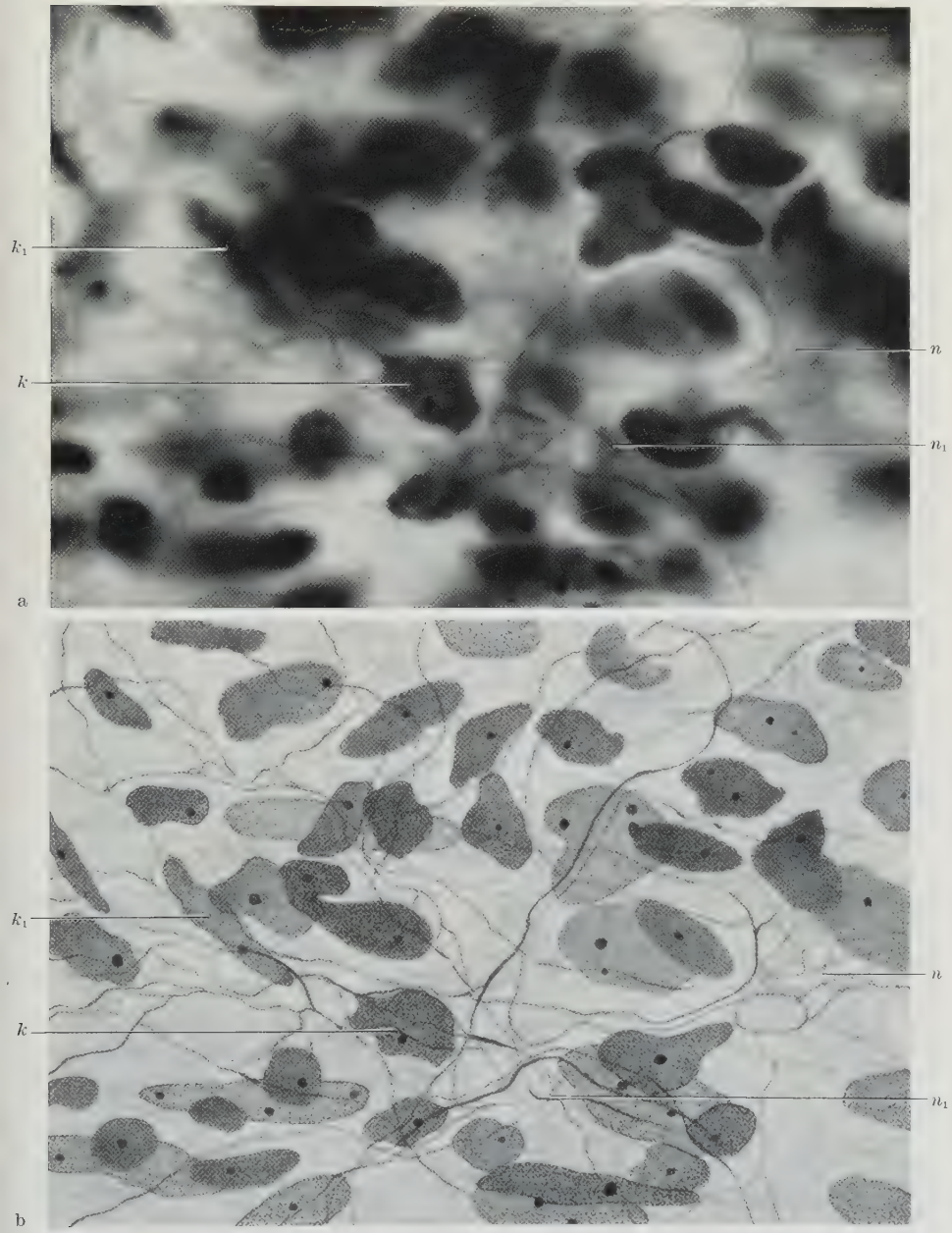


Abb. 3 a u. b. Vegetative Endformation in der Lamina propria des Dünndarmes. Mensch. Photographische und zeichnerische Wiedergabe. Bielschowsky-Feyrter-Methode. Etwa 1900mal vergrößert. k rundlicher Kern, k_1 länglicher Kern innerhalb der vegetativen Endformation, n netzartiger Charakter der vegetativen Endformation, n_1 unabhängig verlaufende Fasern der Endformation

sind örtliche Verschiedenheiten in dem Sinne zu berücksichtigen, daß das Endnetz den Erfolgszellen dicht anliegt (glatte Muskulatur) oder sich in anderen Gebieten, in denen sich nur selten ein Kontakt anbietet (Bindegewebe), ohne Berührung mit den Erfolgszellen ausbreitet.

Bezüglich der Ausdehnung des vegetativen Nervengewebes in der Gefäßwand hat sich der seinerzeit von Reiser (1959) erhobene Befund einer Ausbreitung vegetativer Nervenfasern von der Adventitia durch die Media bis an das Endothel einer Arterie nicht bestätigen lassen.

Aus den Abb. 1—3 ersieht man außer einem unabhängigen und anastomosierenden Verlauf auch eine Verzweigung vegetativer Nervenfasern. Weiterhin besitzen die Fasern und Fibrillen in Abb. 3 keine knötchenförmigen oder varikösen Verdickungen und keine vakuolären Auftreibungen wie stellenweise die fädigen Elemente in den Abb. 1—2. Daher dürften weder die genannten Verdickungen noch innerhalb der Fasern gelegene Vakuolen der vegetativen Endformation stets ein spezifisches morphologisches Gepräge verleihen. Die Wiedergabe der vegetativen Endformation gelingt in ihrer Vollständigkeit photographisch nur selten befriedigend. Die in Abb. 3a stellenweise deutlich erkennbaren Faserelemente kommen in der histologischen Zeichnung (Abb. 3b) besser zum Ausdruck. Demnach sieht man in Abb. 3 bei n einen netzähnlichen Charakter und bei n^1 frei verlaufende, nicht anastomisierende Fasern der vegetativen Endformation. Photographie und zeichnerische Wiedergabe ergänzen sich hiermit und gewährleisten gleichzeitig eine objektive Betrachtungsweise. Die Behauptung Jaboneros (1958) und anderer Autoren, nach der sinngemäß eine flächenhaft ausgebreitete Endformation lediglich in histologischen Zeichnungen zu sehen sei, ist hiermit hinfällig.

Es ist natürlich leicht, die Richtigkeit einer zeichnerischen Darstellung lichtmikroskopischer Befunde anzuzweifeln, wenn sie der vom Autor vertretenen Anschauung im Wege stehen. In vieler Hinsicht ist der guten histologischen Zeichnung in ihrer klaren Darstellungsweise der Vorzug zu geben, zumal die Anfertigung einer mikroskopischen Zeichnung zu längerem und exaktem Mikroskopieren zwingt. Außerdem hat der jeweilige Autor für die korrekte zeichnerische Wiedergabe zu haften und bei einer Überprüfung im Originalpräparat dafür die Verantwortung zu tragen, während man aus einer Mikrophotographie alles mögliche ableiten, irgendwelche morphologischen Unterschiede zwischen Präparat und Photographie und somit der Auslegung der Befunde unter Umständen der photographischen Technik zuschreiben kann.

Man braucht die Resultate und Äußerungen Jaboneros nicht als endgültig zu bewerten, da der Autor innerhalb kurzer Zeit seine Untersuchungsergebnisse und Meinungen wechselt und mit umgekehrten Vorzeichen versieht (s. S. 537). Dennoch bleibt es das Verdienst Jaboneros, der mit Einführung der Silbercarbonattechnik die Möglichkeiten der Darstellung des Nervengewebes erweitert hat, immer wieder auf die von Stöhr (1957), Reiser (1959) und Boeke (1951) zwar behauptete, lichtmikroskopisch aber nicht nachweisbare Verknüpfung nervöser Substanz mit dem Erfolgsplasma hingewiesen zu haben. Bereits 1954 habe ich bei Untersuchungen über die Thymusinnervation auch darauf aufmerksam gemacht, daß durch lichtmikroskopische Methoden das Endgebiet des vegetativen Nervensystems nicht in der von Stöhr und vor allem durch Reiser (1959) gegebenen Definition darzustellen ist. Die vegetative Endformation befindet sich oft in unmittelbarer Nähe der Erfolgszellen und liegt ihnen mehrfach wesentlich dichter an, als es Jabonero (1959) wahrhaben will; doch läßt sich eine einwandfreie Verschmelzung von Nervengewebe mit nicht nervösem Plasma

lichtmikroskopisch nicht sicher nachweisen. Diese Tatsache schmälert aber in keiner Weise die Bemühungen Stöhrs (1957) und Reisers (1959), welche die Masse vegetativ nervöser Substanz aufgedeckt haben. Bei Berücksichtigung der teilweise sehr engen Anlagerung vegetativer Nervenfasern und Fibrillen an die Erfolgszellen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen muß man in solchen Resultaten eine Bestätigung der Ergebnisse Stöhrs (1957) im Hinblick auf die lichtmikroskopisch nachgewiesene große Zahl der vegetativen Endfasern sowie ihrer engen Beziehung zu den Erfolgszellen erblicken. Unter gleichen Gesichtspunkten sind die Befunde und Anschauungen Jaboneros hinsichtlich einer Synapse auf Distanz abzulehnen.

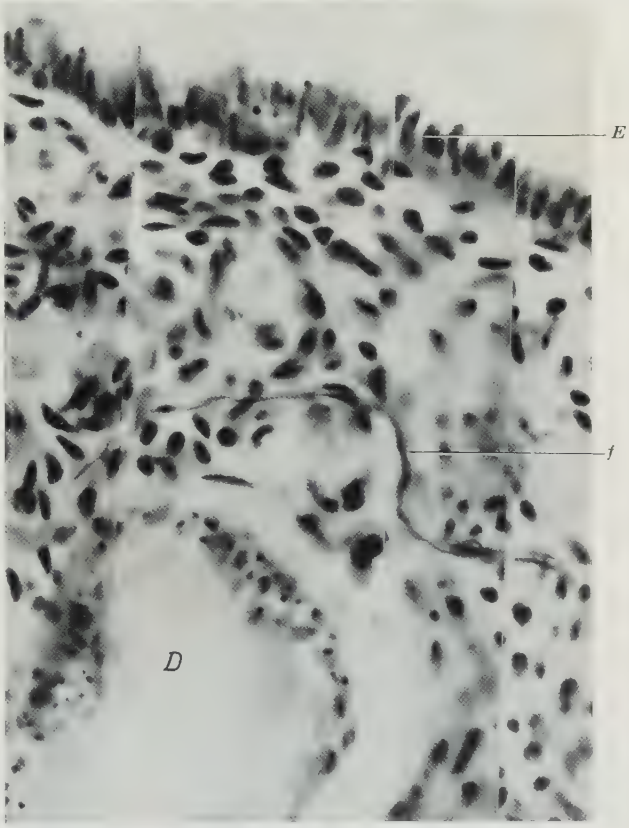


Abb. 4. Feinkalibrige, marklose Nervenfasern in der Schleimhaut des Uterus. Mensch. Bielschowsky-Feyrter-Methode. Etwa 560mal vergrößert. *E* Epithelgewebe, *D* Drüse quer geschnitten, *f* marklose Nervenfasern

Es spricht nicht für eine solide und exakte Untersuchungsweise, wenn man auf Grund elektronenmikroskopischer Befunde die Forschungsergebnisse Stöhrs (1957) mit wenigen Worten abtut, ohne sich vorher selbst durch Betrachtung oder besser durch Anfertigung guter Silberpräparate lichtmikroskopisch orientiert zu haben. Natürlich verlieren die Silbermethoden erheblich an Bedeutung, wenn einige Autoren aus den mit Silbertechniken gewonnen Präparaten zu viel herauslesen und morphologisch nicht fundierte Hypothesen aufstellen und andererseits Autoren wie Abraham und Kirsche nicht in der Lage sind, eine vegetative Endformation an nicht nervösen Zellen zu beobachten. In ähnlicher Weise ist der neurohistologischen Forschung mit der Anwendung von Silberimprägnationen durch Kiss (1951) wenig gedient, der Retikulinfasern für Nervenelemente hält. Dagegen beweisen die Ergebnisse Cajals (1893—1935), Lawrentjews (1934, 1936) und Jaboneros (1961), daß die Silberimprägnationen bei richtiger Anwendung und zurückhaltender Beurteilung zur Klärung des Feinbaues und Ausbreitung des Nervengewebes beitragen können.

Die in Abb. 1—3 gezeigten vegetativen Endformationen verkörpern die mit Silberimprägnationen darzustellenden feinsten vegetativen Strukturen am Ende der vegetativen Nervenbahn. Sie lassen einen netzartigen oder unabhängigen Verlauf ihrer Fasern und ihre stellenweise enge Anlagerung ohne plasmatische Verschmelzung mit den Erfolgszellen erkennen.

Es sei in diesem Zusammenhang nochmals betont, daß die wesentlichen und verdienstvollen Ergebnisse Stöhrs ihre Bestätigung finden, daß man aber aus Gründen der Interpretation der Befunde von der Bezeichnung Terminalreticulum Abstand nehmen sollte. Da der Begriff Terminalreticulum die morphologisch nicht fundierte Annahme einer kontinuierlichen Verbindung von Nervengewebe und Erfolgszellen in sich einschließt, habe ich seit 1954 das Ende der vegetativen Nervenbahn als vegetative Endformation bezeichnet, eine Bezeichnung, der sich jetzt auch Jabonero bedient. Die von Stöhr (1957) unter der Bezeichnung Terminalreticulum abgebildeten Fäserchen sind zweifellos als Nervenelemente zu betrachten. Es handelt sich keineswegs um Retikulinfasern, wie Kirsche annimmt. Die Ursachen der Unstimmigkeiten zwischen den neurohistologischen Forschungsrichtungen (Kontinuität-Kontiguität) sind nicht so sehr in den Befunden, sondern in ihren Interpretationen zu suchen. Eine Verschmelzung von Nervengewebe mit nicht nervösen Erfolgszellen ist lichtmikroskopisch einfach nicht nachweisbar. Eine nervöse Netzbildung kann vorgetäuscht sein, da nach dem Befund in Abb. 3 innerhalb der vegetativen Endformation auch isoliert einherziehende Fasern vorkommen. Bei Betrachtung elektronenmikroskopischer Aufnahmen wird sogar eine lichtmikroskopisch feststellbare Aufzweigung von Nervenfasern fraglich. So ist es durchaus vorstellbar, daß selbst eine lichtmikroskopisch sehr dünnkalibrige Nervenfaser oder periphere „Fibrille" in Wirklichkeit ein Bündel von Axonen verkörpert. Eine lichtmikroskopisch feststellbare Aufzweigung einer Nervenfaser könnte sich nach elektronenmikroskopischen Befunden als eine Entfaltung eines kleinen Bündels von Axonen erweisen.

Bei Betrachtung der Abb. 1—3 könnte der Eindruck entstehen, als ob in einem vom vegetativen Nervensystem versorgten Gewebe jede Zelle morphologisch nachweisbar innerviert wird. Man findet durchaus nicht überall einen solchen Reichtum peripherer vegetativer Nervensubstanz. So bleiben z. B. Strecken der Gefäßbahn von der vegetativen Endformation unberührt. Jabonero (1953) weist im Hinblick auf die Gefäßinnervation ebenfalls auf nervenfreie Kapillarstrecken hin. So wechselt eine reichliche nervöse Versorgung der Erfolgszellen mit einer spärlichen oder fehlenden (jedenfalls vorerst nicht nachweisbaren) Innervationsweise ab. Sehr oft werden nervenfreie Strecken auf eine ungenügende Imprägnation zurückgeführt, was sich leicht behaupten, aber nicht beweisen läßt. Doch ist der Faktor der Imprägnationsschwierigkeiten nicht zu unterschätzen. So schreibt Stöhr noch 1957, daß sich die Innervation des Endometrium (Mensch) auf die basale Schicht zu beschränken scheint. Da in Abb. 4 in geringer Entfernung vom Epithelgewebe des Uterus einwandfreie Nervenfasern verlaufen, so dürfte die von mehreren Autoren allerdings erfolglos versuchte Darstellung von vegetativen Nervenfasern in der Functionalis auf Unzulänglichkeiten der histologischen Technik zurückzuführen sein. Walter (1959) bildet ebenfalls vegetative fibrilläre Netze in der Zona functionalis des Endometriums vom Rind ab. Die vegetativen Fasern begeben sich bis in die Nähe des Epithels.

Außerdem erblickt man Teile der vegetativen Endformation einmal in engem Kontakt mit Erfolgszellen, andererseits in einiger Entfernung von ihnen. Auch erstrecken sich vegetative Endabschnitte, die den gleichen Aufbau wie jene mit der Muskulatur in Beziehung stehenden Formationen zeigen, durch bindegewebige Bezirke, in denen sich, abgesehen von Bindegewebszellen, keine Kontaktmöglich-

keit bietet. So kann man sich nach lichtmikroskopischen Resultaten nicht *nur* für einen Kontakt oder andererseits *nur* für eine erhebliche Distanz zwischen

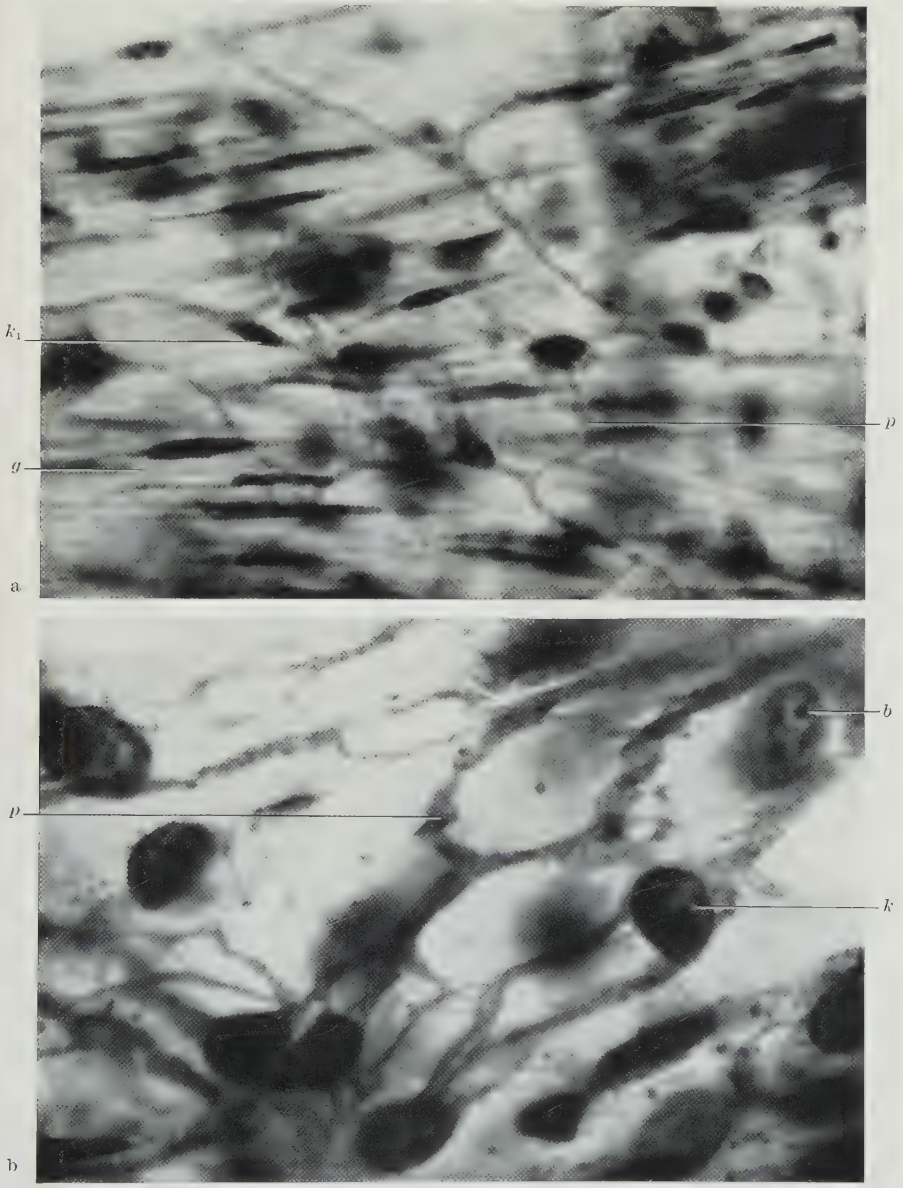


Abb. 5a u. b. Granuliertes Plasmanetz der vegetativen Endformation. Magen und Dünndarm. Kaninchen. Native Einschlußfärbung mit saurem Hämatoxylin nach EHRLICH. a etwa 600mal vergrößert, b etwa 1400mal vergrößert. p Plasmanetz, k verzweigter Anteil des Plasmanetzes mit rundlichem Kern, k_1 länglicher Kern im Plasmanetz, g glatte Muskulatur, b Bindegewebszelle in der Dünndarmschleimhaut

Erfolgsgewebe und vegetativer Endformation entscheiden. Die Tatsache des gleichförmigen Aufbaues der vegetativen Endformation in Berührung mit den Erfolgszellen und bei ihrer Ausbreitung im Bindegewebe ohne häufige celluläre

Kontaktmöglichkeit läßt an eine sekretorische Tätigkeit der vegetativen Endformation denken, da nicht an jeder Stelle eine individuelle Innervation vorzuliegen scheint. Bis heute sind jedoch die von Jabonero angeführten morphologischen Merkmale für eine sekretorische Tätigkeit der vegetativen Endformation für mich nicht überzeugend (s. S. 531). Jedenfalls kann von einer morphologisch feststellbaren Innervation aller nicht nervösen Zellen durch das vegetative Nervensystem im Sinne Reisers (1959) nicht die Rede sein.

Ein ähnliches Verhalten des vegetativen Nervensystems zum Erfolgsgewebe scheint sich auch nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen abzuzeichnen. So haben u. a. Caesar, Edwards und Ruska (1958) sowie Caesar (1958) deutliche synaptische Beziehungen zwischen vegetativen Nervenfasern und glatten Muskelzellen gesehen, während nach Hager und Tafuri (1959) im Colon des Meerschweinchens an feinen Faserbündeln kein Kontakt der Axone mit dem Muskelcytolemma feststellbar ist. Gansler (1960) behauptet nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen am Froschmagen und Meerschweinchendarm, daß an der glatten Muskulatur keine spezifischen Synapsenstrukturen existieren.

Die vegetativen Nervenfasern und Fibrillen liegen nach Stöhr (1959) im Plasma mit länglichen Kernen versehener Schwannscher Zellen (auch Schwannsches Leitgewebe genannt) und in interstitiellen Zellen mit rundlichen Kernen. Die Kerne der interstitiellen Zellen liegen hauptsächlich an den Knotenpunkten oder Verzweigungsstellen, die länglichen Schwannschen Kerne vornehmlich in den Strängen der vegetativen Endformation. So ließen sich die in Abb. 1—3 bei k_1 sichtbaren Kerne als solche Schwannscher Zellen, bei k als Kerne interstitieller Zellen bezeichnen. Durch die sehr dichte Anordnung der Fibrillen in unmittelbarer Umgebung der Kerne interstitieller Zellen bekommen diese eine Ähnlichkeit mit kleinen Nervenzellen. Deswegen hat man ihre vermutliche Tätigkeit mit der von Ganglienzellen verglichen und ihnen eine regulatorische Arbeitsweise zugesprochen. Auch wird die Möglichkeit einer Abgabe von Stoffen durch die interstitiellen Zellen diskutiert. Leider läßt eine gewisse Unregelmäßigkeit im Auftreten der interstitiellen Zellen nicht immer die erwähnten Deutungen zu. Zusammenfassende Berichte über die Anordnung, Bauweise und vermutliche Funktion der von Gerlach und Cajal entdeckten interstitiellen Zellen finden sich bei Stöhr (1957), Reiser (1959) und Jabonero (1953).

Die Methoden, die lediglich die Nervenfasern und Fibrillen der vegetativen Endformation hervorbringen, genügen nicht, um Schwannsche von interstitiellen Zellen abzugrenzen. Bisher ist es nur durch die Anwendung der Silbercarbonatmethode nach Jabonero (1948) oder besser durch die native Einschlußfärbung mit Ehrlichschem Hämatoxylin nach Feyrter möglich, das Plasma der vegetativen Endformation deutlich darzustellen. In den Abb. 5a und b von unfixierten Präparaten erkennt man das Plasma der vegetativen Endformation, das sich in Nativschnitten in einem graublauen Farbton zeigt. Es handelt sich anscheinend um ein mit länglichen und runden Kernen ausgestattetes Plasmanetz granulärer Natur. Zellgrenzen sind nicht zu finden. Ich spreche daher in diesem Zusammenhang von einem lichtmikroskopischen Zellnetz, auch wenn elektronenmikroskopische Untersuchungen Membranen zwischen den einzelnen kernhaltigen Abschnitten der vegetativen Endformation aufdecken.

Abb. 6a—d. Verzweigte Anteile des vegetativen Plasmanetzes. Kaninchen. Native Einschlußfärbung mit saurem Hämatoxylin nach Ehrlich. k verzweigte Abschnitte mit rundlichen Kernen (interstitielle Zellen), k_1 länglicher Kern (Schwannsche Zelle), k_2 mehrere rundliche Kerne an Verzweigungsstelle des vegetativen Plasmanetzes. a etwa 600mal vergrößert, b etwa 560mal vergrößert, c etwa 700mal, d etwa 560mal vergrößert, auf 9/10 verkleinert

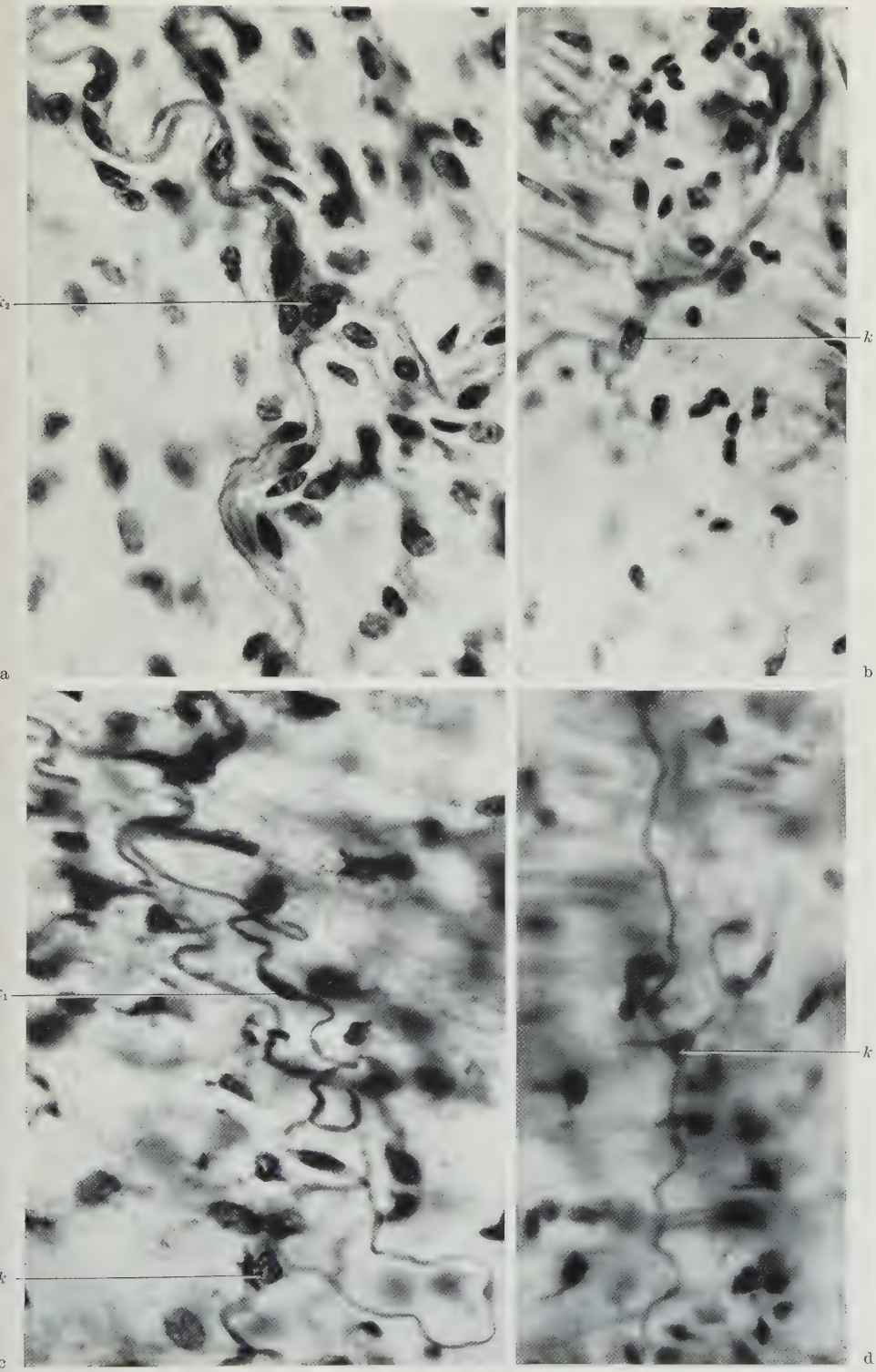


Abb. 6a—d (Erklärung s. S. 526)

Die Abb. 5 und 6 demonstrieren sehr gut, wie verzweigte, rundliche Kerne enthaltende Abschnitte der vegetativen Endformation mit fadenförmigen Anteilen verbunden sind, die längliche Kerne besitzen. In Abb. 5a liegt das kernhaltige Netz auf der glatten Muskulatur des Magens (Kaninchen), in Abb. 5b breitet es sich in der Dünndarmschleimhaut aus. Wenn man will, kann man die plasmatischen Bezirke mit runden Zellkernen den erwähnten interstiellen Zellen, diejenigen mit länglichen Kernen den Schwannschen Zellen einordnen, so daß eine Verschmelzung von Schwannschem Plasma mit interstitiellen Zellen stattfindet. Ebenso umgekehrt läßt sich das netzartige Gefüge als eine einheitliche, nur unterschiedliche Kernformen enthaltende Formation auffassen. Silbercarbonat- und Ehrlich-Präparate weisen innerhalb der vegetativen Endformation keinen Unterschied zwischen Schwannschen und interstitiellen Zellen auf. Hierauf hat Jabonero vielfach hingewiesen. Es besteht daher kein Grund, im Bereich der vegetativen Endformation Schwannsche Zellen und interstitielle Zellen zu unterscheiden. Auch geben morphologische Befunde vorerst keine Rechtfertigung, cholinergische, adrenergische oder sensible interstitielle Zellen zu unterscheiden. Das in Abb. 5a und b wiedergegebene kernhaltige Netz ist als die Trägermasse der in Silberpräparaten sichtbaren Neurofibrillen und Nervenfasern anzusehen. Beim Vergleich von Abb. 3 mit Abb. 5b ist anzunehmen, daß die meisten fibrillären oder faserigen Strukturen in den gezeigten granulierten Plasmanetzen (Abb. 5 u. 6) liegen müssen. Bemerkenswert ist die sehr feinmaschige Verknüpfung innerhalb der Plasmanetze. Im Nervennetz erblickt man nicht nur unterschiedlich geformte, sondern auch verschieden anfärbbare Kerne. In früheren Untersuchungen konnten in Nativpräparaten große, helle anfärbbare und etwas kleinere, dunkler tingierbare Kerne von ebenfalls rundlicher Form in der vegetativen Endformation festgestellt werden. Es erscheint vorerst nicht berechtigt, aus der verschiedenen Gestalt der Kerne auf eine unterschiedliche Funktion zu schließen. Manchmal sind die an den Verknüpfungs- bzw. Verzweigungsstellen des Netzes befindlichen Kerne nicht rundlich, sondern auch länglich oder dreieckig gestaltet. Außerdem besitzen die Knotenpunkte des Netzes gelegentlich mehrere Zellkerne (Abb. 6a). Die Abb. 6b, c und d geben Verzweigungsstellen des Plasmanetzes wieder, in denen rundliche Kerne liegen. Gleichzeitig erblickt man in Abb. 6c den kontinuierlichen Zusammenhang verzweigter mit rundlichen Kernen versehener Anteile mit granulierten Plasmabändern, die längliche Kerne enthalten. Aus den Befunden in Abb. 5 u. 6 geht hervor: Ein in Nativpräparaten darstellbares Plasmanetz ist das Trägergerüst für die meisten in Silberpräparaten erkennbaren Neurofibrillen und Nervenfasern. Das granuläre Netz zeigt lichtmikroskopisch keine Zellgrenzen und enthält längliche, rundliche sowie dreieckige Zellkerne. Auch kommen Übergangsformen vor. Da die Anteile des Plasmagefüges mit länglichen Kernen den gleichen Bau wie jene Abschnitte mit anders gestalteten Kernen und gleiche färberische Eigenschaften aufweisen, ist es nicht erforderlich, eine Unterteilung der vegetativen Endformation in Schwannsche (Lemnoblasten) und interstitielle Zellen (nervöser Natur) durchzuführen. Dennoch sollte man hierbei die Bedeutung unterschiedlicher Kernformen nicht vernachlässigen, die möglicherweise den morphologischen Ausdruck verschiedener Funktionszustände darstellen Auch die von Stöhr beschriebenen Schlingenterritorien entsprechen einzelnen Anteilen des geschilderten Plasmanetzes, das sicherlich mit dem System der

interstitiellen Zellen nach MEYJLING oder dem distalen Syncytium nach JABONERO (1953) identisch ist. JABONERO hat schon seit langer Zeit betont, daß eine auf Grund morphologischer Tatsachen begründete Zergliederung der vegetativen Endformation in interstitielle Zellen und Schwannsche Zellen einfach nicht möglich ist, wenn man von den verschiedenen Kernformen absieht.

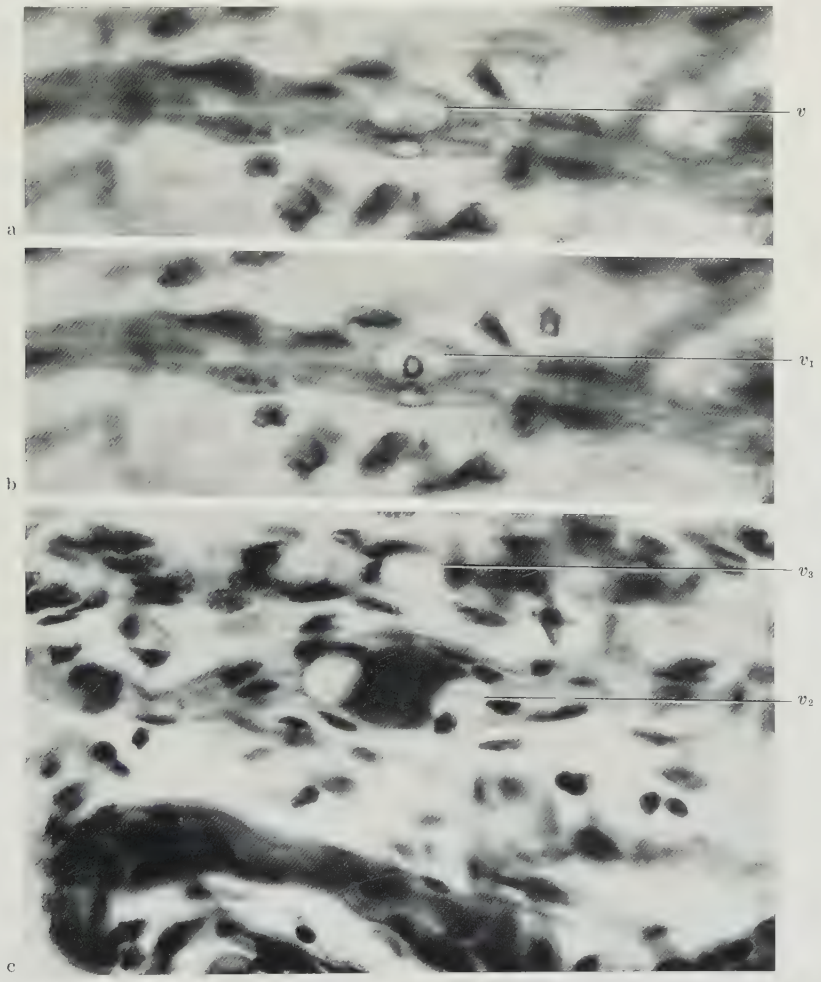


Abb. 7a—c. Künstlich entstandene Vakuolen in vegetativen Plasmasträngen und Nervenzellen. Magen. Kaninchen. Native Einschlußfärbung mit saurem Hämatoxylin nach EHRLICH. a u. b etwa 720mal vergrößert, c etwa 560mal vergrößert, v Vakuolen, v_1 Vakuolen mit Luftbläschen, v_2 Vakuolen in Nervenzelle. v_3 Vakuolen in Kapillaren. Erklärung siehe Text

Nach MEYJLING setzt sich die periphere, vegetative Nervenbahn aus einem Syncytium autonomer interstitieller Zellen zusammen. Der Autor vergleicht die asynaptisch gebauten interstitiellen Zellen mit primitiven Ganglienzellen. Die efferenten vegetativen Nervenfasern sollen am Syncytium endigen, das durch Abgabe spezifischer Stoffe die Funktion der Gewebe reguliert.

Während STÖHR hauptsächlich die sehr fibrillenreichen, mit rundlichen Kernen versehenen Bezirke der vegetativen Endformation den interstitiellen Zellen, die

Anteile mit länglichen Kernen den Schwannschen Zellen einreiht, betrachtet Jabonero (1961) ungeachtet der Kernform die gesamte Endformation als ein von den postganglionären Nervenfasern unabhängiges System. Nach Stöhr (1957) verkörpern die marklosen Nervenfasern und Fibrillen im Schwannschen Leitgewebe und im Plasma der interstitiellen Zellen das periphere Ende der Fortsätze von Nervenzellen. Schwannsches Leitgewebe (Lemnoblastennatur) und interstitielle Zellen (nervöser Natur) sind untrennbar miteinander verschmolzen. Die Anschauung Stöhrs (1957), in den interstitiellen Zellen seien kleine Ganglienzellen zu erblicken, läßt sich vorläufig morphologisch nicht begründen, da den interstitiellen Zellen die an jeder peripheren Nervenzelle vorhandenen Hüllzellen fehlen. Für Jabonero besitzen die Abschnitte der vegetativen Endformation ein eigenes Gerüst von marklosen Nervenfasern und Neurofibrillen. Die postganglionären Nervenfasern endigen in oder an der Endformation. Auch der Meinung Jaboneros vermag ich nicht zuzustimmen, da bisher Endigungen postganglionärer Nervenfasern an oder in der vegetativen Endformation nicht aufzufinden waren.

In Silbercarbonatschnitten (Abb. 10–17) erkennt man nahezu regelmäßig, in Bielschowsky-Präparaten nur gelegentlich gleichzeitig die Nervenfasern, Fibrillen und das granulierte Plasma der vegetativen Endformation. Während in Nativ-Präparaten das Plasma gleichmäßig granuliert erscheint, tauchen nach Formolfixierung und anschließeuder Anwendung der Silbercarbonatmethode neben Nervenfasern ungleich große Granula und Vakuolen im Plasmanetz auf. Jabonero (1955) sieht im unterschiedlichen Auftreten von verschieden großen Granula, in einer abgeschwächten oder erhöhten Argentophilie des syncytialen Plasmaverbandes und in der Anwesenheit von Vakuolen den morphologischen Ausdruck einer Neurosekretion. Die von mir seit 1952 an Nativschnitten durchgeführten Untersuchungen der vegetativen Endformation im menschlichen Magen, an der A. uterina sowie an tierischem Material haben nicht eine einzige Vakuole gezeigt. Auch nach den Befunden der Abb. 5 und 6 enthält die vegetative Endformation keine Vakuolen. Außerdem war es möglich, den Einfluß einer Formolfixierung auf die Entstehung von Vakuolen im nervösen Plasma zu klären (Knoche 1958). Danach treten nach Formolfixierung und Färbung mit Ehrlichschem Hämatoxylin verschieden große, optisch leere Vakuolen in den Plasmaanteilen der vegetativen Endformation auf, die in Nativschnitten eine gleichmäßige Granulierung zeigt und keinen Raum für irgendwelche Vakuolen frei läßt. Somit dürften die lichtmikroskopisch sichtbaren Vakuolen der vegetativen Endformation als Resultat der Fixierung zu bewerten sein. Auch Szentagothai (1957) ist nicht von der Existenz von Vakuolen in der nicht fixierten Endformation überzeugt; Boeke und Lawrentjew halten die Vakuolen für Fixierungsprodukte. Somit läßt sich einer peripheren Neurosekretion in der vegetativen Endformation im Sinne Jaboneros nicht zustimmen, da der Verfasser zur Fundierung seiner Anschauung die erst durch eine Fixierung entstandenen Vakuolen verwendet.

In letzter Zeit hat sich auch Walter mit der Anordnung und Bauweise der vegetativen Endformation beschäftigt und deutliche Vakuolen in erstaunlich großer Zahl in Nativschnitten beobachten können. Hierin sieht Jabonero (1959) die Bestätigung seiner Befunde und Anschauungen, doch sind auch die von Walter in den Strängen der vegetativen Endformation gefundenen Vakuolen

künstlich entstanden. Bei der zuerst von Feyrter, dann von mir (Knoche 1952) und später von Walter durchgeführten nativen Einschlußfärbung werden die wasserhaltigen Präparate nach ihrer Anfärbung ohne Einschlußmittel mit einem Deckglas versehen und umrandet. Bei dieser Manipulation gelangen meistens mehr oder weniger zahlreiche kleine und große Luftblasen in das Präparat und drücken sich beim Auftragen des Deckglases, manchmal unter Zerfall in unzählige, kleine Bläschen, in das unfixierte, weiche Cytoplasma ein. Wenn man *sofort* nach dem Auftragen des Deckglases das Präparat durchmustert, so sieht man viele Vakuolen im Plasma, die Luftblasen enthalten. Allerdings verlassen die Luftblasen die Vakuolen sehr schnell, die sie selbst gebildet haben. Auf diese Weise werden im unfixierten Plasma des Nervengewebes Vakuolen vorgetäuscht, was Walter leider übersehen hat. Wenn man die Präparate nach ihrer Anfärbung ohne Deckglas durchsieht, ist keine Vakuole feststellbar. Legt man anschließend das Deckglas auf, so erkennt man deutlich an den Stellen, an denen Luftbläschen mit eingeschlossen wurden, wie sich diese in das Plasma eindrücken und so Vakuolen ausbilden, eine Zeitlang in ihnen verweilen, um sie dann zu verlassen. Die Abb. 7 b gibt kleine Luftbläschen in Vakuolen vegetativer Plasmastränge aus Nativschnitten wieder. Das gleiche Nervengewebe wurde ständig beobachtet und dabei ein Entweichen der Luftbläschen festgestellt. Die Vakuolen blieben erhalten (Abb. 7 a). Bei sorgfältigem Auftragen des Deckglases unter Vermeidung des Einschließens von Luftblasen treten auch keine Vakuolen im Plasma der Endformation auf. Daher sind auch die künstlich entstandenen „Vakuolen" nicht als optisch leere Räume zu betrachten, die z. B. bei Herauslösung paraplasmatischer Einschlüsse in der Zelle zurückbleiben. Walter hält eine Identität der von ihm in Nativschnitten beschriebenen mit den von Jabonero (1958) dargestellten Vakuolen für nicht erwiesen. In Silberpräparaten Jaboneros enthält nur die vegetative Endformation vakuoläre Bildungen, in den Nativschnitten Walters treten die Vakuolen in Nervenzellen, Fasern und in der Endstrecke der vegetativen Nervenbahn auf. Eine Übereinstimmung von Jaboneros und Walters Befunden ist also nicht gesichert. Außerdem erscheinen die Vakuolen nicht nur im Nervengewebe, sondern auch in anderen Gewebsarten, z. B. in glatten Muskelzellen oder in Kapillaren. Abb. 7 c zeigt einige in der oben geschilderten Weise entstandenen Vakuolen in einer Nervenzelle und in einem kleinen Blutgefäß. Somit sind die von Walter abgebildeten Vakuolen als Kunstprodukte aufzufassen. Die vom Autor demonstrierten Vakuolen werden von ihm teilwiese selbst als Luftblasen bezeichnet und erscheinen in einigen Abbildungen erheblich größer als die vegetativen Plasmastränge, die Walter irrtümlich für Nervenzellfortsätze hält. Es ist außerdem kaum vorstellbar, daß sich die Vakuolen in der vegetativen Endformation Feyrter und mir in eigenen langjährigen Untersuchungen entzogen haben, wenn sie nach Walter für die nervöse vegetative Peripherie spezifisch sein sollen. Auch Haferkamp (1959) hat bei der Darstellung der vegetativen Endformation in Nativschnitten keine Vakuolen im vegetativen Plasma bemerkt. Jaboneros (1959) Behauptungen, nach denen im unterschiedlichen Auftreten von verschieden großen Granula und Vakuolen der morphologische Ausdruck einer Neurosekretion zu sehen ist, lassen sich vorerst weder an fixierten noch an unfixierten Präparaten begründen.

Taubert (1960) bestätigt im Hinblick auf die Anwesenheit der Vakuolen im vegetativen Endgebiet die Resultate Walters. Offenbar standen dem Autor keine eigenen Befunde zur Verfügung, da er die diesbezüglichen Abbildungen einigen Arbeiten Walters entnimmt, sie um 90° dreht oder seitenverkehrt wiedergibt und als eigene Untersuchungsergebnisse veröffentlicht.

Gelegentlich wird in Silberpräparaten und Ehrlichschnitten eine morphologische Beziehung zwischen vegetativen Nervenfasern und Bindegewebszellen ersichtlich. Nach Stöhrs, Boekes (1951), Riegeles und meinen Ergebnissen durchlaufen feinste, der vegetativen Endformation angehörige Faserelemente verzweigte Zellen, die man als Histio- oder Fibrocyten bezeichnen kann. Stöhr

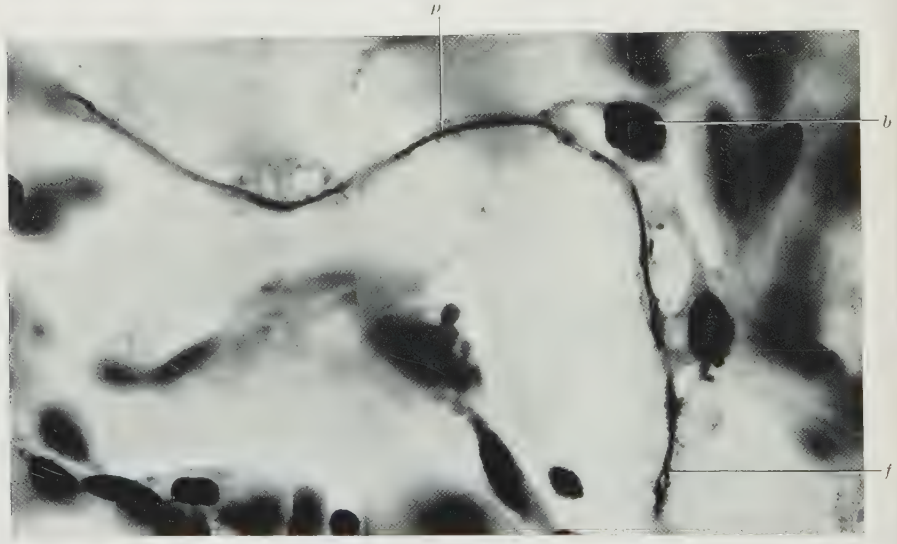


Abb. 8. Bindegewebszellen im Zusammenhang mit dem Plasma der vegetativen Endformation. Ovar. Mensch. Bielschowsky-Methode. Etwa 830mal vergrößert. *b* Bindegewebszelle, *f* marklose Nervenfasern, *p* Plasma der vegetativen Endformation

meint, daß in Ermanglung des Plasmas Schwannscher oder interstitieller Zellen das Plasma von Bindegewebszellen an seine Stelle tritt. Danach können das Schwannsche Plasma, die interstitiellen Zellen und Bindegewebszellen der vegetativen Endformation als Leitbahn dienen. Andererseits ließe sich von einer Innervation der Bindegewebszellen sprechen. Davon abgesehen steht die vegetative Endformation stellenweise mit Bindegewebszellen in enger Beziehung. Jabonero (1958) stellt jede lichtmikroskopisch nachweisbare Verbindung von Nervengewebe und Bindegewebszellen in Abrede und bezweifelt die Befunde der oben genannten Autoren. Er behauptet, daß der von mir beschriebene Zusammenhang des Plasmas der vegetativen Endformation mit Bindegewebszellen vom histologischen Zeichner nicht beobachtet und die gegenseitige Abgrenzung beider Formationen sorgfältig dargestellt wurde. Da ich die Präparate selbst mikroskopiere und die histologischen Zeichnungen selbst anfertige, besteht Jaboneros Behauptung sicher zu Unrecht. Wenn sich der Autor jedoch auf einer Photographie besser als auf einer histologischen Zeichnung zurechtfindet, so mag er sich in der Abb. 8 über die Tatsache einer lichtmikroskopisch darstellbaren Verbindung von Bindegewebszellen mit dem Plasma der vegetativen

Nervenfasern überzeugen. Zwei aus der Marksubstanz des menschlichen Ovars stammende verzweigte Zellen hängen untereinander und mit dem Leitplasma einer vegetativen Nervenfaser zusammen. Zwischen beiden Formationen sind keine Zellgrenzen sichtbar. Wenn elektronenmikroskopische Befunde eine Membran zwischen beiden Gewebsarten zeigen, so bleibt doch die dichte Anlagerung von relativ wenigen verzweigten Bindegewebszellen an Fasern der vegetativen Endformation morphologisch und funktionell bedeutsam. Vielleicht läßt sich obiger Befund in dem Sinne deuten, daß Bindegewebszellen den dünnkalibrigen vegetativen Nervenfasern eine zusätzliche Hülle liefern.

Nach Feyrter wären die abgebildeten, als Bindegewebszellen erkannten Elemente intercaläre Zellen zu nennen, die zwischen vegetativer Endformation und Erfolgszellen gelagert sind. Feyrter unterscheidet unansehnliche, einen kleinen, chromatinreichen, vielgestaltigen Kern tragende intercaläre Zellen und unansehnliche verzweigte Zellen mit einem großen chromatinarmen Zellkern. Jabonero und Coronini (1957) sehen die intercalären Zellen als Bindegewebszellen an, halten jedoch eine Mitbeteiligung der erwähnten Zellen bei der Tätigkeit der vegetativen Endformation für möglich. Nach eigenen Beobachtungen hat Feyrter zweifellos Bindegewebszellen und teilweise auch die mit rundlichen Kernen versehenen Verknüpfungsstellen der vegetativen Endformation (interstitielle Zellen) als intercaläre Zellen bezeichnet. Eine deutliche Abgrenzung der intercalären Zellen einerseits von Bindegewebszellen und andererseits vom nervösen Plasmanetz wurde vom Autor nicht exakt durchgeführt, so daß kein zwingender Grund vorliegt, bei künftigen Untersuchungen den intercalären Zellen besondere Beachtung zu schenken. Davon abgesehen ist an der stellenweise dichten Anlagerung von Bindegewebszellen an die vegetative Endformation nicht zu zweifeln. Eine befriedigende Deutung solcher Befunde ist zur Zeit nicht zu geben.

Reiser (1959) macht sich die celluläre Gliederung innerhalb der vegetativen Endformation sehr leicht, indem er Zellkerne gleicher Form und Chromatinmasse einmal als Kerne intercalärer, zum anderen als Kerne Schwannscher Zellen deutet.

Folgende morphologische Gründe lassen die Notwendigkeit einer Unterteilung der vegetativen Endformation in interstitielle Zellen und Schwannsche Zellen als überflüssig erscheinen: Die rundlichen Kerne der angeblichen interstitiellen und die länglichen Kerne der Schwannschen Zellen befinden sich in einem einheitlichen Plasmanetz. Eine gegenseitige Abgrenzung beider Zellarten ist nach Silber- und Ehrlich-Präparaten nicht sicher durchführbar. Gegen die Deutung der interstitiellen Zellen als kleine Ganglienzellen spricht nicht nur das Fehlen der jeder peripheren Nervenzelle eigenen Hüllzellen, sondern auch das färberische Verhalten. In Nativpräparaten nehmen die echten Nervenzellen einen rötlich-violetten Farbton an, während sich die mit länglichen Kernen (Schwannsche Kerne) und mit rundlichen Kernen (Kerne der interstitiellen Zellen) ausgestatteten Anteile der vegetativen Endformation stets graublau anfärben. Außerdem bieten sich nach lichtmikroskopischen Befunden keine morphologischen Anhaltspunkte dafür, die Neurofibrillen und marklosen Nervenfasern im Plasma der sog. interstitiellen Zellen als ihre eigenen plasmatischen Differenzierungsprodukte zu betrachten. Auch kann man der Anschauung Jaboneros nicht zustimmen, nach der die vegetative Endformation als ein von den postganglionären Nervenfasern

unabhängiges System interstitieller Zellen zu bewerten sei. Von einer Innervation der vegetativen Endformation durch die postganglionären Nervenfasern kann keine Rede sein, weil ein kontinuierlicher Zusammenhang von postganglionären Nervenfasern mit den Fibrillen und dünnkalibrigen Nervenfasern der vegetativen Endformation zu beobachten ist.

Die vor der vegetativen Endformation lokalisierten Nervenbündel besitzen oft eine endothelartige Umhüllung, die nach Ausbildung der Endausbreitung verlorengeht. In Abb. 9a erkennt man den Abgang granulierter Plasmastränge aus einem von einer kernhaltigen Hülle umgebenen Nervenbündel. Das Plasma der bereits zur vegetativen Endformation gehörenden Stränge zeigt die gleiche granuläre Beschaffenheit und ebenfalls einen graublauen Farbton wie die Protoplasmabänder im Nervenbündel. So besteht auch nach den aus Nativ-Präparaten erzielten Resultaten kein Grund, das Plasma der vegetativen Endformation vom Schwannschen Plasma der zuführenden Nervenfasern abzugrenzen. Die Abb. 9b gibt aus einem Silberpräparat ein dickes, von einer kernhaltigen Hülle umschlossenes Nervenbündel wieder, das dickkalibrige markhaltige und dünnere marklose, ebenfalls von Schwannschen Kernen begleitete Nervenfasern enthält. Ein kleinerer, nur noch aus marklosen Fasern zusammengesetzter Strang verläßt seitlich das größere Nervenbündel und wird noch eine Strecke lang von einer aus länglichen Zellen zusammengefügten Hülle umgeben, die im weiteren Verlauf der Nervenfasern offenbar (bei ↑) verlorengeht. Von hier ab liegen die vegetativen Nervenfasern nur noch in kernhaltigen, granulierten Plasmasträngen (bei *E*). Der an der Haut erhobene Befund sei beigefügt, um den kontinuierlichen Verlauf markloser Nervenfasern in dicken und dünnen, durch kernhaltige Hüllen abgegrenzte Nervenbündel bis in die hüllenlose vegetative Endformation zu demonstrieren. Irgendwelche Endigungen postganglionärer Nervenfasern an oder in der vegetativen Endformation sind nicht feststellbar. Die Endausbreitung des vegetativen Nervensystems wird daher durch ein mit länglichen oder rundlich-ovalen Kernen versehenes Plasmanetz granulärer Beschaffenheit verkörpert, das von den postganglionären Nervenfasern abstammende feinkalibrige Nervenfasern und Neurofibrillen enthält. Eine einwandfreie Verbindung des Plasmanetzes und der isoliert verlaufenden oder netzartig verknüpften Fibrillen mit dem Erfolgsplasma findet nicht statt.

Die Frage nach der Herkunft der fädigen Strukturen der vegetativen Endformation läßt sich möglicherweise mit Hilfe von Durchschneidungsversuchen besser als nach Normalbefunden beantworten. Nach Erfahrungen der experimentellen Forschung unterliegen alle vom Perikaryon abgetrennten Fortsätze einer Ganglienzelle einer sekundären Degeneration, die aber nicht auf das mit der geschädigten Nervenzelle synaptisch verbundene Neuron übergreift. Wenn die Faserelemente der vegetativen Endformation die Endstrecke der postganglionären Nervenfasern darstellen, müßte sich die vegetative Endformation nach Entfernung der betreffenden Nervenzellen oder Durchtrennung ihrer Neuriten degenerativ verändern oder mindestens eine morphologisch faßbare Reaktion zeigen. Damit würde sich die Ansicht Lawrentjews bestätigen, nach der sich das vegetative Endgebiet aus Lemnoblasten und den Endverzweigungen postganglionärer Nervenfasern zusammensetzt. Bei Annahme einer weitgehenden Unabhängigkeit der vegetativen Endformation von postganglionären Nerven-

fasern dürften nach Resultaten mit Durchschneidungsversuchen die Fasern der vegetativen Endformation nicht degenerieren. Vielmehr müßte die an den postganglionären Nervenfasern ablaufende Degeneration beim Erreichen der vege-

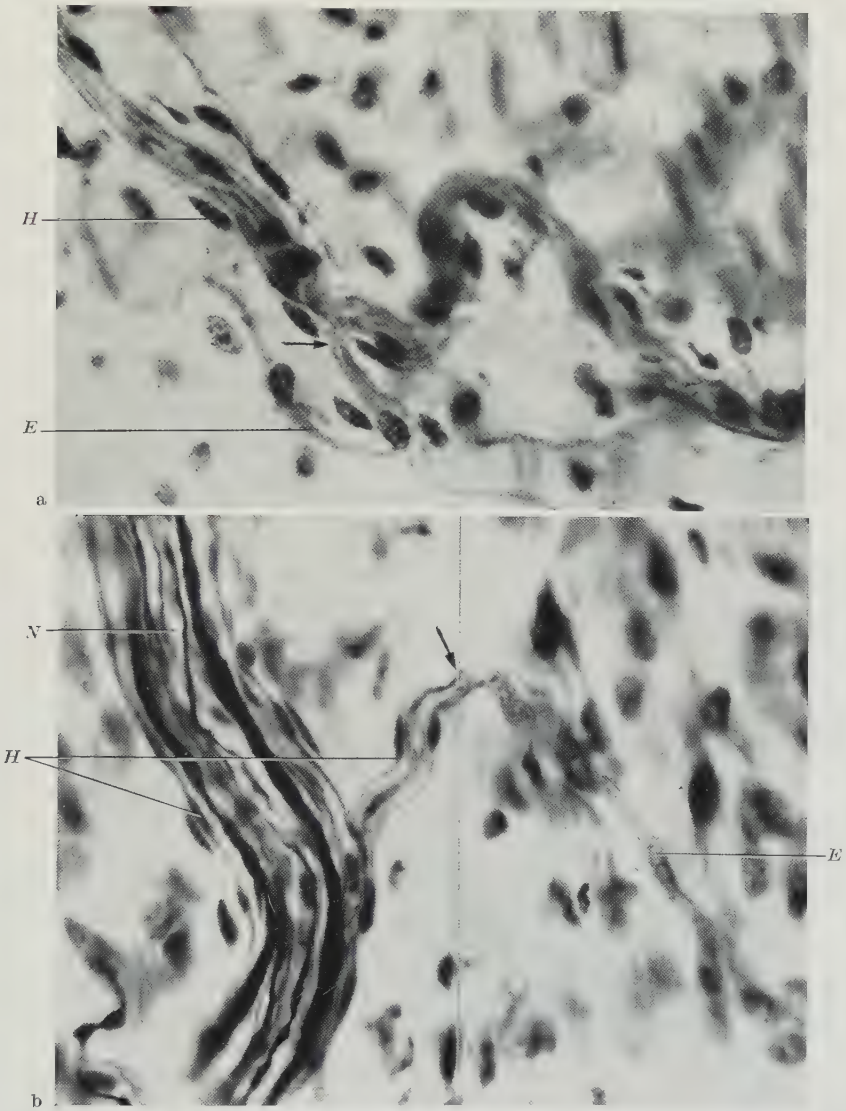


Abb. 9 a u. b. Abgang von Strängen der vegetativen Endformation aus Nervenbündeln mit kernhaltigen Hüllen. a Native Einschlußfärbung mit saurem Hämatoxylin nach EHRLICH. Magen. Kaninchen. Etwa 560mal vergrößert. b Haut. Mensch. Bielschowsky-Methode. Etwa 600mal vergrößert. *H* Kernhaltige Hülle, *N* Nervenbündel, *E* Stränge der vegetativen Endformation

tativen Endformation haltmachen und nicht auf sie übergreifen, wenn das vegetative Endnetz als ein geschlossenes Neuron im Sinne JABONEROS (1953) anzusehen ist. Da nach Schädigung ihrer Neuriten die synaptischen Formationen sehr gut imprägnierbar sind, sollten auch nach Entfernung des Ggl. cerv. sup. die von JABONERO postulierten und gesuchten Endigungen postganglionärer

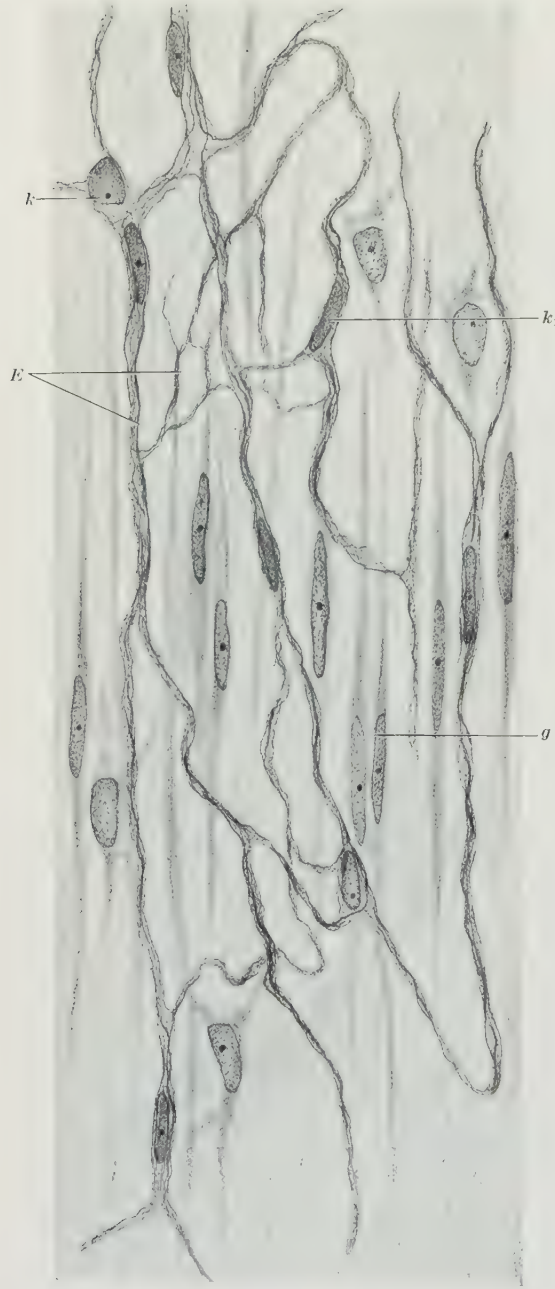


Abb. 10. Normale vegetative Endformation aus der Nickhaut. Katze. Silbercarbonattechnik nach Jabonero. Etwa 820mal vergrößert. *E* vegetative Endformation, *g* glatte Muskelfasern, *k* Verzweigter Abschnitt mit rundlichem Kern (interstitielle Zelle), k_1 länglicher Abschnitt mit länglichem Kern (Schwannsche Zelle)

Nervenfasern an oder in der vegetativen Endformation im Bereich der Nickhaut auftreten.

Durchschneidungen postganglionärer Nervenfasern sind bereits von Lawrentjew u. Mitarb. durchgeführt worden. Einige Autoren stellten schon nach mehr oder weniger kurzer Zeit post operationem eine Degeneration der vegetativen Endformation fest. Andere berichten, daß sich eine Durchschneidung der zuführenden Neuriten nicht in einer morphologisch faßbaren Weise auf die vegetative Endformation auswirkt. Nach Reiser (1959) bleiben nach Entfernung des Ganglion Gasseri die Anteile des Terminalreticulums in der Cornea erhalten. Der meines Erachtens schon in der Anlage zum Scheitern verurteilte Versuch, die Selbständigkeit der vegetativen Endformation nachzuweisen, wird auch von Schimert (1938) mit Recht kritisiert, weil man nach Ausschaltung des Ggl. semilunare im wesentlichen nur die Trigeminusfasern schädigt. Dagegen haben Llombart und Fornes (1953, 1957) nach Exstirpation des Ggl. cerv. cran. Degenerationserscheinungen der vegetativen Endformation im Cornealrand gesehen. Ein weitaus günstigeres Objekt zur Beobachtung der Degeneration der vegetativen Peripherie nach Durchschneidung der zuführenden Nervenfasern ist die Nickhaut. Einige Blutgefäße und die glatte Muskulatur der Nickhaut erhalten ihre nervöse Versorgung vom Ggl. cerv. sup. Lawrentjew und Borowskaja haben wenige Tage nach Durchtrennung des sympathischen Halsstammes, cranial vom oberen Halsganglion, deutliche Veränderungen an Ner-

venfasern und der vegetativen Endformation in der Nickhaut der Katze beobachtet. Obwohl bei diesen Versuchen einige Nervenfasern intakt blieben, gehen andererseits aus den eindrucksvollen zeichnerischen Wiedergaben verschiedene Stufen der Entartung der vegetativen Endformation hervor (Anschwellungen, massenhaftes Auftreten von verschieden großen Varikositäten, Fragmentationen). Bullon und Stiefel (1955) und Bullon (1956) beschreiben ebenfalls, unter ähnlichen Versuchsanordnungen, auftretende Entartungen innerhalb der vegetativen Endformation an Blutgefäßen und glatten Muskelfasern der Nickhaut. Auch Genis und Clemente (1957) konnten mit einer Durchtrennung des Halssympathicus eine Degeneration des vegetativen Endgebietes in der Membrana nictitans erreichen. Das die Blutgefäße der äußeren Augenmuskulatur versorgende Endnetz degeneriert nach Entfernung des Ggl. cerv. cran. (Szentagothai).

Nelemans und Dogterom (1955) behaupten, daß sich das terminale, periphere, nervöse Netzwerk in der Zunge des Frosches nach Durchschneidung des N. hypoglossus und N. glossopharyngicus verändert. Erst nach sympathischer und parasympathischer Denervation sieht man in der Iris der Albinoratte und im Kaninchenohr eine schnell ablaufende Degeneration des vegetativen Endgebietes. Eine Veränderung der vegetativen Endausbreitung in der Nickhaut nach Exstirpation des oberen sympathischen Halsganglions konnten die Verfasser nicht beobachten. Die Resultate der von den erwähnten Autoren durchgeführten Untersuchungen sind demnach nicht immer übereinstimmend, vielfach sogar widersprechend. Auch beim Studium der betreffenden Arbeiten Jabonеros gelingt es nicht, Klarheit über die Reaktion der vegetativen Endformation auf eine Nervendurchschneidung zu gewinnen. Nach Entfernung des Ggl. cerv. sup. der Katze vermochte der Autor 1956 keinerlei Veränderungen an der vegetativen Endformation der Nickhaut festzustellen. Auch im Kaninchenohr (nach Durchschneidung des N. auricularis magnus und Schädigung des Ggl. cerv. sup.) bleibt die vegetative Endformation vollständig erhalten, so daß Jabonero (1958) die von anderen Autoren beobachteten Degenerationen als nicht stichhaltig ansieht und die Befunde Reisers (1936), Yoshitoschis (1937), Nelemans und Dogteroms bestätigt. In einer kürzlich erschienenen Arbeit Jabоneros kann man das Gegenteil lesen. Außer einigen entscheidenden Korrekturen seiner früheren Ergebnisse spricht der Autor von einer Degeneration der vegetativen Endformation, die unter den gleichen Bedingungen wie 1956 erzielt wurden. Es ist erstaunlich, daß Jabonero (1956) nach Exstirpation des Ggl. cerv. sup. einmal die Unversehrtheit, einige Zeit später dagegen die Degenerationsformen der vegetativen Endformation bildlich belegen kann. Um mir an Hand eigener Präparate eine Anschauung über die Reaktionsweise der vegetativen Endformation in der Nickhaut auf eine Nervenzellausschaltung bilden zu können, habe ich bei 28 Katzen das Ggl. cerv. sup. entfernt und das Verhalten der vegetativen Endformation auf diesen Eingriff hin untersucht. Es soll in diesem Zusammenhang keine ausführliche Beschreibung der in unterschiedlichen Zeitabständen post operationem ablaufenden verschiedenartigen degenerativen Veränderungen erfolgen, sondern lediglich festgestellt werden, ob die vegetative Endausbreitung nach Durchschneidung der zuführenden Neuriten völlig erhalten bleibt, teilweise oder ganz degeneriert. Um degenerativ verändertes Nervengewebe besser von

einer intakten Endformation abgrenzen zu können, sei die Abb. 10 beigefügt, die eine normale vegetative Endformation aus der Nickhaut der Katze wiedergibt. In einem fein granulierten Plasmaverband, der längliche und runde Kerne enthält, erstrecken sich feine fädige Elemente. Die glatt konturierten Nervenfasern und Fibrillen zeigen nur gelegentlich fibrilläre Varikositäten, überkreuzen sich oder verlaufen parallel zueinander.

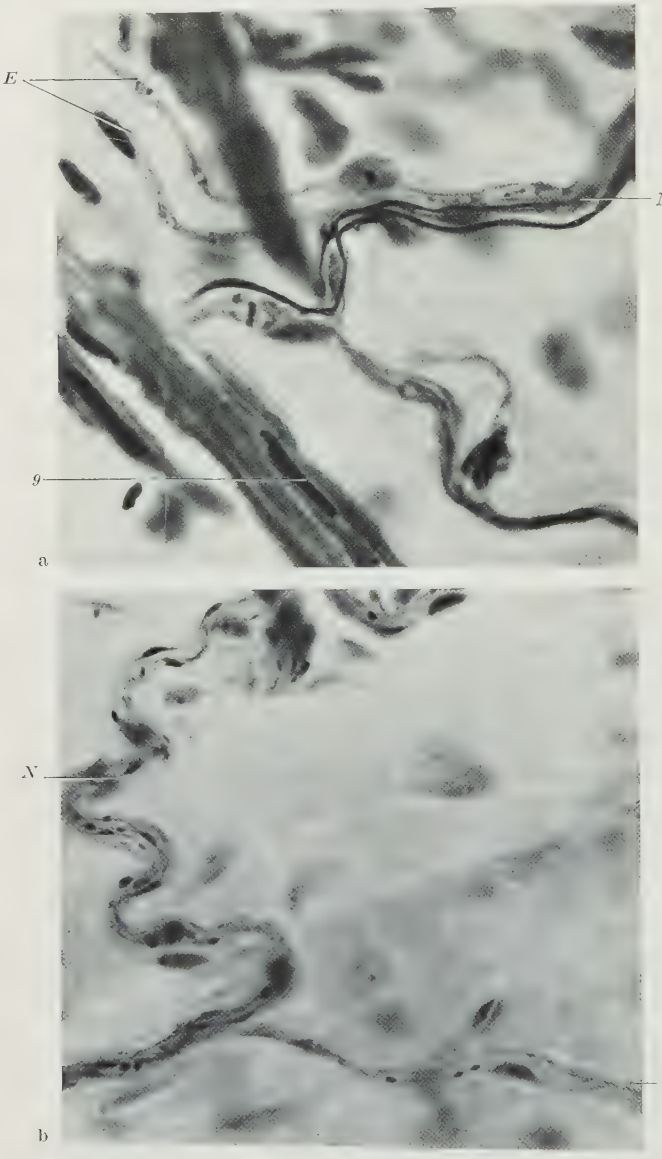


Abb. 11a u. b. Degenerierte Nervenfasern in Nervenbündeln und Strängen der vegetativen Endformation. Nickhaut. Katze. Exstirpation des Ggl. cerv. sup. Silbercarbonattechnik nach Jabonero. *N* Nervenbündel, *E* vegetative Endformation, *g* glatte Muskulatur. a etwa 750mal vergrößert, b etwa 560mal vergrößert

Die Abb. 11a und b geben dünne Nervenbündel und von ihnen abgehende feinere Stränge in der Nickhaut der Katze (nach Entfernung des oberen sympathischen Halsganglions) wieder, Bildungen, die man bereits zur vegetativen Endformation zu zählen hat. Die fädigen Strukturen sind im Vergleich zu normalen Nervenfasern (s. Abb. 3 und 10) deutlich verändert, so daß die Fäserchen der Endformation als Fortsätze der Nervenzellen des Ggl. cerv. sup. zu betrachten sind. Die von ihren Ganglienzellen abgetrennten Neuriten zeigen stark imprägnierbare Verdickungen, die in unterschiedlicher Größe, Form und ungleichen Abständen voneinander auftreten. Außerdem machen sich die Veränderungen der Nervenfasern durch Fragmentationen, vakuoläre Auftreibungen und granulären Zerfall bemerkbar. Die erwähnten morphologischen Erscheinungen müssen als Ausdruck eines degenerativen Geschehens gewertet werden. Die degenerativen Merkmale lassen sich sehr gut und zugleich zahlreich in der Zeit von 2—6 Tagen

post operationem beobachten. Es ist durchaus berechtigt, von einer erhöhten Argentophilie geschädigten Nervengewebes im Sinne der Befunde von Lawrentjew zu sprechen. Die unter experimentellen Eingriffen auftretenden varikösen Auftreibungen lassen sich viel intensiver als die Varikositäten normaler Nervenfasern der vegetativen Endformation imprägnieren, auch wenn Jabonero (1956) diese Tatsache abstreitet. Faserhaltige Protoplasmabänder, wie in Abb. 11a bei *E* sichtbar ist, brauchen nicht immer am Ende vegetativer Nervengeflechte zu liegen, sondern können bereits innerhalb von Nervenbündeln verlaufen (vgl. Abb. 9 und 11). In ihnen zeigen sich ebenso wie in der vegetativen Endausbreitung degenerierte Nervenfasern. Als Folge der Ganglienexstirpation werden degenerierte Nervenfasern in Nervenbündeln und in der vegetativen Endformation im Bereich des Bindegewebes, an vielen Blutgefäßen und an der glatten Muskulatur der Nickhaut beobachtet.

In Abb. 12 ist die vegetative Endformation an Kapillaren der Nickhaut im Zustand 3 Tage nach Exstirpation des Ggl. cerv. sup. wiedergegeben. Ein nahezu gleichmäßig granuliertes Plasmanetz enthält längliche, an den Verzweigungsstellen rundlich-ovale Kerne. Eine Gruppierung in Schwannsche und interstitielle Zellen auf Grund morphologischer Merkmale ist nicht gerechtfertigt. Daß sich die vegetative Endformation in einem degenerativen Zustand befindet, ist weniger am granulierten Plasma als an den fädigen Strukturen zu erkennen. Sehr dünnkalibrige Nervenfasern durchziehen nur noch streckenweise das Plasmanetz und besitzen stark imprägnierte Verdickungen. Außerdem liegen intensiv imprägnierbare Körnchen und Ringe frei im Plasma, ohne eine Verbindung mit Nervenfasern erkennen zu lassen. Ob es sich bei den argyrophilen Klumpen um veränderte Varikositäten nicht imprägnierter Nervenfasern handelt, ist nicht sicher bestimmbar. Bei stärkster lichtmikroskopischer Vergrößerung bemerkt man einmal feinste marklose Fasern mit den erwähnten Verdickungen, andererseits aber keine Verbindungsfasern zwischen den frei liegenden Körnchen unterschiedlicher Größe. Daher hat man an einen möglichen granulären Zerfall der Nervenfasern zu denken. Jedenfalls befinden sich die Faserelemente der vegetativen Endformation in einem degenerativen Zustand, der sich 3 Tage nach Entfernung des Ggl. cerv. sup. besonders eindrucksvoll morphologisch faßbar machen läßt. Bullon konnte an Kapillaren der Nickhaut ebenfalls degenerierte vegetative Endfasern feststellen. Danach erscheinen die Bruchstücke der Axone wie eine „körnige Spur". Lawrentjew bildet degenerativ veränderte Terminalgeflechte an den Blutgefäßen deutlicher ab als Bullon Ramirez.

Auch die in Begleitung kleiner Arterien und Arteriolen befindlichen Anteile der vegetativen Endformation werden von einer Gangliektomie betroffen. In Abb. 13a sieht man neben einer Arteriole gelagerte vegetative Nervenfasern, die mit den bereits geschilderten knötchenartigen Verdickungen und granulierten Aufquellungen versehen sind. Es handelt sich auch hierbei um verändertes Nervengewebe der Endformation, das den von Stöhr aus einem Tumor des Brustgrenzstranges und aus dem Grund eines callösen Magenulcus degenerierten Nervenfasern ähnelt. In der Glatzenhaut habe ich (Knoche 1954) degenerierte vegetative Endformationen beobachtet, deren Faserlemente von groben, klumpigen oder eigenartigen Gebilden durchsetzt waren und einen fein- oder grobkörnigen Zerfall zeigten. Ähnliche Degenerationserscheinungen vegetativen

Nervengewebes findet Hilgenberg (1959) in der Wand des Sinus caroticus bei Hypertonikern. Man kann in der Zeit von 2—6 Tagen post operationem verschiedene degenerative Zustände der vegetativen Endformation nachweisen.

Abb. 12. Degenerativ veränderte vegetative Endformation an Kapillaren. Nickhaut. Katze. Exstirpation des Ganglion cervicale superius. Silbercarbonattechnik nach Jabonero. Etwa 820mal vergrößert, auf $^4/_5$ verkleinert. *K* Kapillaren, *E* degenerierte vegetative Endformation, *v* verzweigter Abschnitt der Endformation (früher interstitielle Zelle), *s* länglicher Zellkern (früher Schwannsche Zelle), *B* Bindegewebszellen

Während zu dieser Zeit das Bild der noch zusammenhängenden, intensiv imprägnierten Fasern mit Verdickungen und granulierten Aufquellungen streckenweise noch vorherrscht, tauchen bereits deutlich fragmentierte Nervenelemente auf. Dieses Stadium der Entartung ist in den Abb. 13b und c wiedergegeben. Der an der Kapillarwand gelagerte Plasmastrang in Abb. 13c enthält keine fädigen Strukturen mehr. Die sehr groben Körnchen stellen keineswegs die natürliche granuläre Beschaffenheit der vegetativen Endformation dar, sondern müssen als

Produkte eines degenerativen Geschehens angesehen werden. Die Herkunft der unterschiedlichen Granula ist schwer zu ermitteln; eine Vergrößerung oder Zusammenballung der normalerweise sehr feinen Körnchen im vegetativen Endplasma ist während der Degeneration möglich. Andererseits lassen sich die groben, klumpenartigen Gebilde als Reste vorher an bestimmten Stellen verdickter Nervenfasern deuten. Die Ergebnisse stimmen mit den Resultaten SZENTAGOTHAIS überein, der nach Exstirpation des Ggl. cerv. sup. die sog. plasmatischen

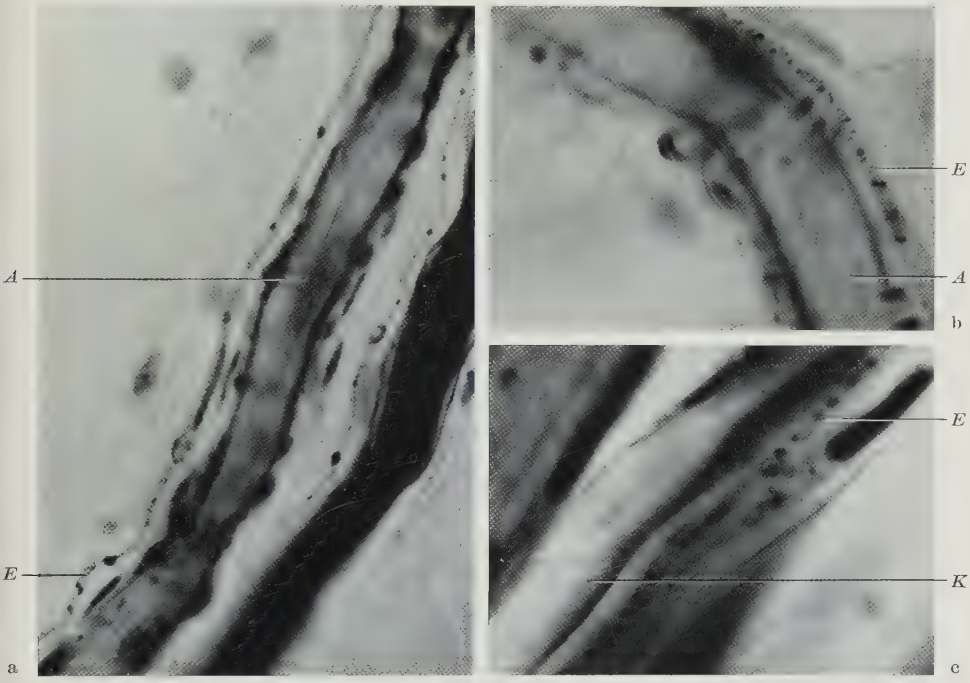


Abb. 13a—c. Degenerativ veränderte vegetative Endformation an Gefäßen der Nickhaut. Katze, Exstirpation des Ggl. cerv. sup. Silbercarbonattechnik nach JABONERO. *A* Arteriole, *K* Kapillare. *E* degenerativ veränderte Endformation. a Etwa 640mal vergrößert, b etwa 780mal vergrößert, c etwa 1700mal vergrößert

vegetativen Nervenfasern voller Zerfallskörner abgebildet hat. In Abb. 13b liegt ein ähnlich gestalteter Plasmastrang der Media einer kleinen Arterie dicht an. Die wiedergegebenen Zustandsbilder des veränderten Nervengewebes in der Nickhaut sind gut imprägnierten Präparaten entnommen, so daß der Einwand, die Nervenfasern und Fibrillen seien infolge mangelhafter Imprägnation nicht sichtbar, entfällt. Die später zu besprechenden Befunde über entartetes Nervengewebe an der glatten Muskulatur zeigen ebenfalls in vollständiger Darstellung knotig verdickte Nervenfasern, daneben Faserfragmente und frei liegende Klumpen und Ringe innerhalb der Plasmastränge der vegetativen Endformation. Die glatten Konturen an den normalen, nur feinste oder gar keine Varikositäten enthaltenden Nervenfasern sind verlorengegangen. Nach einer Durchschneidung erblickt man dafür aneinandergereihte argyrophile Graunla oder plumpe Stäbchen, die stellenweise noch fädig verbunden sind, gelegentlich aber wahrscheinlich infolge einer Faserfragmentation jeden Zusammenhang verloren haben.

Nach Durchschneidung des N. opticus lassen sich im Zwischenhirn ähnliche Befunde erheben (Knoche 1956, 1960).

Ein wellenförmig verlaufender Strang der vegetativen Endformation, der den Schlingenterritorien Stöhrs (1957) oder den nervösen Protoplasmabändern Jaboneros (1948) entspricht, ist in Abb. 14a bei starker Vergrößerung zu erkennen. Der im Bindegewebe gelegene Plasmastrang enthält in unregelmäßiger Verteilung verschieden große, argyrophile Gebilde von hakenförmiger und rundlicher, ringartiger oder länglicher Gestalt. Feinkalibrige Nervenfasern oder Neurofibrillen sind nicht mehr vorhanden. Die cervicale Sympathektomie hat sich somit auf alle Fäserchen der abgebildeten Teile der vegetativen Endformation ausgewirkt. Dieser vom Normalbild abweichende Bau vegetativer Endfasern ist nicht auf technische Unzulänglichkeiten, sondern auf einen durch die Durchschneidung der postganglionären Nervenfasern hervorgerufenen degenerativen Prozeß zurückzuführen, der sich bis in die vegetativen Endfasern erstreckt. Danach verkörpern die Faserlemente der vegetativen Endformation die Endstrecke der postganglionären Nervenfasern. Bei Konzeption der Anschauung Jaboneros (1953), nach der die vegetative Endformation ein aus interstitiellen Zellen zusammengesetztes unabhängiges System mit neurofibrillären Differenzierungen darstellt, müßten die zahlreichen Fasern und Fibrillen der vegetativen Endformation intakt geblieben sein. Hierfür ergaben sich jedoch schon an Hand von Normalbefunden keine Anhaltspunkte. Auch die experimentellen Untersuchungen stützen die These Jaboneros (1953) morphologisch nicht, da die sekundäre Degeneration auch die fädigen Elemente der vegetativen Endformation befällt. Jabonero vertritt außerdem die Meinung, daß die postganglionären Nervenfasern in der vegetativen Endformation oder an ihrer Oberfläche endigen. Nach Durchschneidungen von Neuriten sind erfahrungsgemäß ihre Endapparate besonders gut für eine deutliche Imprägnation geeignet. Somit müßten nach Exstirpation des Ggl. cerv. sup. z. B. ring- oder kolbenartige Endigungen postganglionärer Nervenfasern in der vegetativen Endformation auftauchen. In den auf der Muskulatur, an den Blutgefäßen und im Bindegewebe ausgebreiteten Endformationen ließen sich weder in Normalpräparaten noch nach Durchschneidung der postganglionären Nervenfasern vom Ggl. cerv. sup. Endigungen nachweisen. Auch in der Nähe der kernhaltigen Abschnitte der vegetativen Endformation werden keine Endigungen postganglionärer Nervenfasern sichtbar. Vielmehr sieht man auch dort die geschilderten degenerativen Merkmale. In Abb. 14b und c erkennt man kernhaltige verzweigte Bezirke der vegetativen Endformation, die bisher in der Literatur als interstitielle Zellen bezeichnet wurden. Wie ebenfalls aus Abb. 14 hervorgeht, ist es nicht erforderlich, ein Organ vollständig zu entnerven, um die Fibrillen und Granula einiger Anteile der vegetativen Endformation zum Verschwinden zu bringen. Der aus der Nickhaut 4 Wochen nach Durchschneidung der postganglionären Nervenfasern entnommene Plasmastrang (Abb. 14d) enthält keine Fibrillen und Granula mehr. Er ist nur noch in Umrissen an dem gewundenen Verlauf und an der Lage der Zellkerne zu erkennen. Die besprochenen Befunde sind demnach im Sinne der Vorstellungen Lawrentjews und Szentagothais zu deuten. Szentagothai bildet interstitielle Zellen mit total degenerierten Nervenelementen (stark imprägnierbare Zerfallskörner) aus der Albinoratte ab. Die Entartung der Nervenfasern wurde durch

eine zirkuläre Einschneidung der Scheiden des N. opticus erzielt. Nach cervicaler Sympathektomie treten in der vegetativen Endformation der Blutgefäße an der

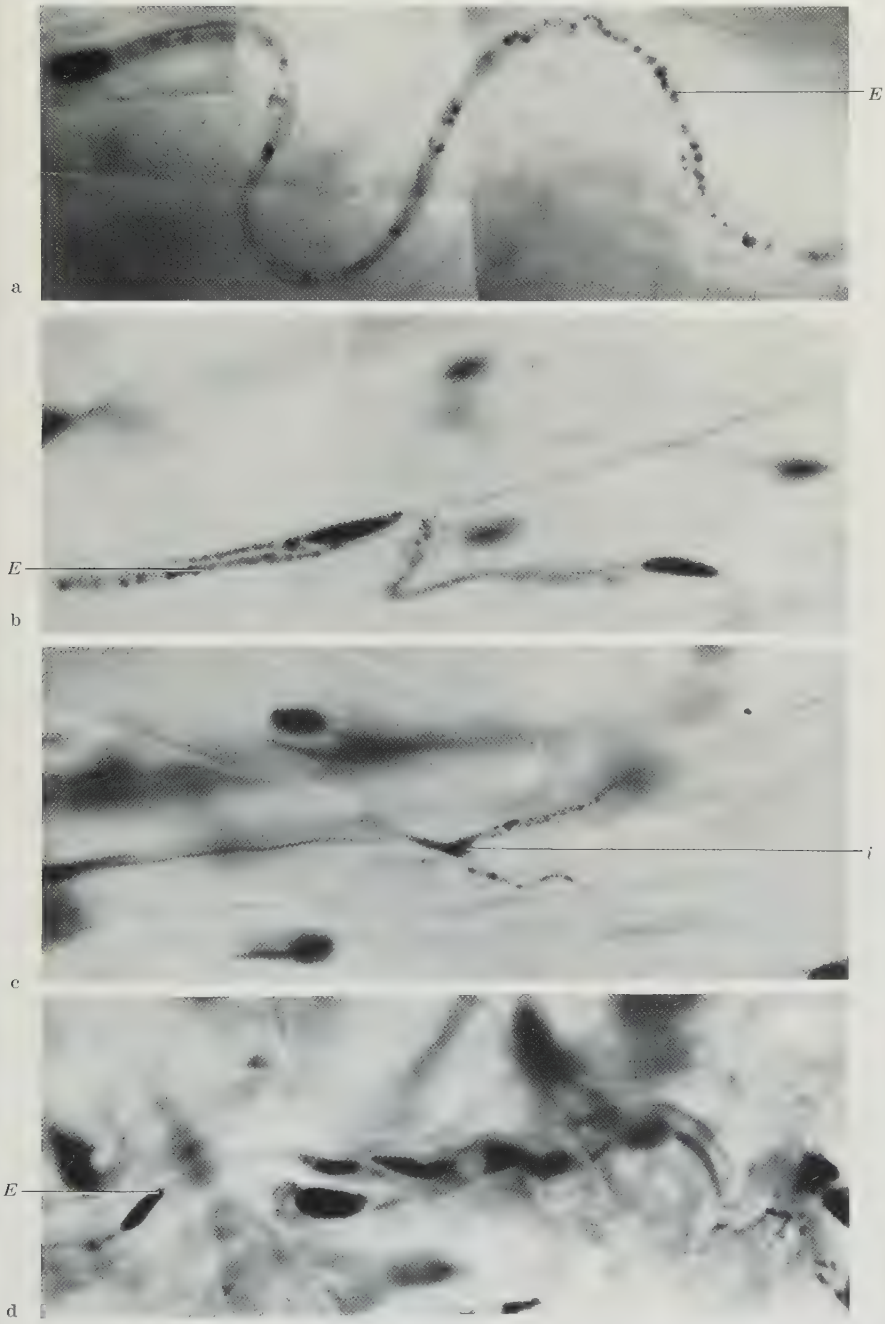


Abb. 14a—d. Degenerativ veränderte Abschnitte der vegetativen Endformation. Nickhaut. Katze. Exstirpation des Ggl. cerv. sup. Silbercarbonattechnik nach JABONERO. *E* Degenerierte Endformation, *i* sog. interstitielle Zelle. a Etwa 1800mal, b etwa 1900mal, c etwa 1800mal, d etwa 1500mal vergrößert

Abb. 15. Degenerativ veränderte vegetative Endformation auf der glatten Muskulatur. Nickhaut. Katze. Exstirpation des Ggl. cerv. sup. Silbercarbonattechnik nach JABONERO. Etwa 650mal vergrößert, auf $^{7}/_{9}$ verkleinert. *E* Degenerierte Endformation, *N* degenerierte Nervenfasern, *g* glatte Muskulatur

äußeren Augenmuskulatur deutliche Zerfallskörner auf. In den vegetativen Endgeflechten der Gefäße im Herzmuskel erscheinen nach Entfernung des Ggl. stellatum entartete Nervenfasern und Fragmente. Auf Grund der erwähnten Beobachtungen erblickt auch Szentagothai in den fädigen Strukturen der vegetativen Endformation die Endaufzweigungen postganglionärer Nervenfasern. Der Autor sieht keinen Grund, die fädigen Elemente der Terminalgeflechte als ein Differenzierungsprodukt der protoplasmatischen Fasern zu betrachten, wenn sie nach Durchschneidung der zuführenden Nervenfasern degenerieren.

Mit Lawrentjew konnte ich eine Degeneration der die glatte Muskulatur der Nickhaut versorgenden vegetativen Endformation feststellen. Die degenerativen Merkmale treten auch hier 2—6 Tage nach einer Sympathektomie in einem für die Imprägnation geeigneten Zustand auf. In Abb. 15 sind die zuführenden Nervenbündel und die vegetativen Endformationen in netzartiger Anordnung, in verzweigter Form und in einem zu den glatten Muskelfasern parallelen Verlauf wiedergegeben. Das mit der Silbercarbonatmethode nach Jabonero (1946) dargestellte Nervengewebe gliedert sich in fädige Elemente und in granulierte Plasmastränge bzw. Netze. Offenbar befinden sich die Axone innerhalb des Plasmanetzes in einem unterschiedlichen degenerativen Zustand, da man erstens Fasern mit kompakten, ringartigen oder blasigen Verdickungen beobachtet und zweitens in den weitaus meisten Anteilen der vegetativen Endausbreitung nur noch verschieden große, stark argyrophile Gebilde (klumpen- und ringartig) in isolierter Lagerung findet, die den von Szentagothai beschriebenen Zerfallskörnern gleichzusetzen sind. Auch in diesem Bereich ist weder eine Endigung postganglionärer Nervenfasern an der vegetativen Endformation noch ein spezifischer Endigungstyp der vegetativen Endausbreitung an glatten Muskelzellen zu sehen. Es sind nur sehr wenige glatt konturierte Nervenfasern vorhanden, die möglicherweise als intakte Nervenfasern zu bezeichnen wären. Diese ließen sich sympathischen Nervenelementen einreihen, die ihr Ursprungsgebiet nicht im sympathischen Halsganglion besitzen. Oder es handelt sich vielleicht um sehr widerstandsfähige Nervenfasern, die erst zu einem späteren Zeitpunkt degenerative Zeichen aufweisen. Andererseits könnte man in den von der Ganglienexstirpation verschont gebliebenen Nervenfasern parasympathische oder sensible Elemente vermuten. Auch könnte es sich um Neuriten von Ganglienzellen handeln, die noch oberhalb des sympathischen Halsganglions gelegen sind und nicht mit exstirpiert wurden. Bullon Ramirez deutet die persistierenden Fasern als solche sensibler Natur oder parasympathischer Herkunft.

Nach Stöhr (1957), Reiser (1959), Meyjling und Jabonero (1953) werden in der vegetativen Endformation sympathische und parasympathische Elemente zu einem einheitlichen Ganzen vereinigt, obwohl es bisher nicht gelang, im vegetativen Endnetz die fädigen Elemente möglicher verschiedener Herkunft histologisch zu unterscheiden. Nach vorläufigen Untersuchungen zeigen nach cervicaler Sympathektomie nur sehr wenige Fasern in der vegetativen Endformation an der glatten Muskulatur normale Strukturen. Entweder sind auf Grund dieser Beobachtungen die Auffassungen obiger Autoren zu korrigieren oder es sind nur sehr wenige oder keine parasympathischen Anteile in der vegetativen Endformation enthalten. Sollten parasympathische Nervenfasern über das Ggl. cerv. sup. die Nickhaut erreichen, so ist es mit einer cervicalen

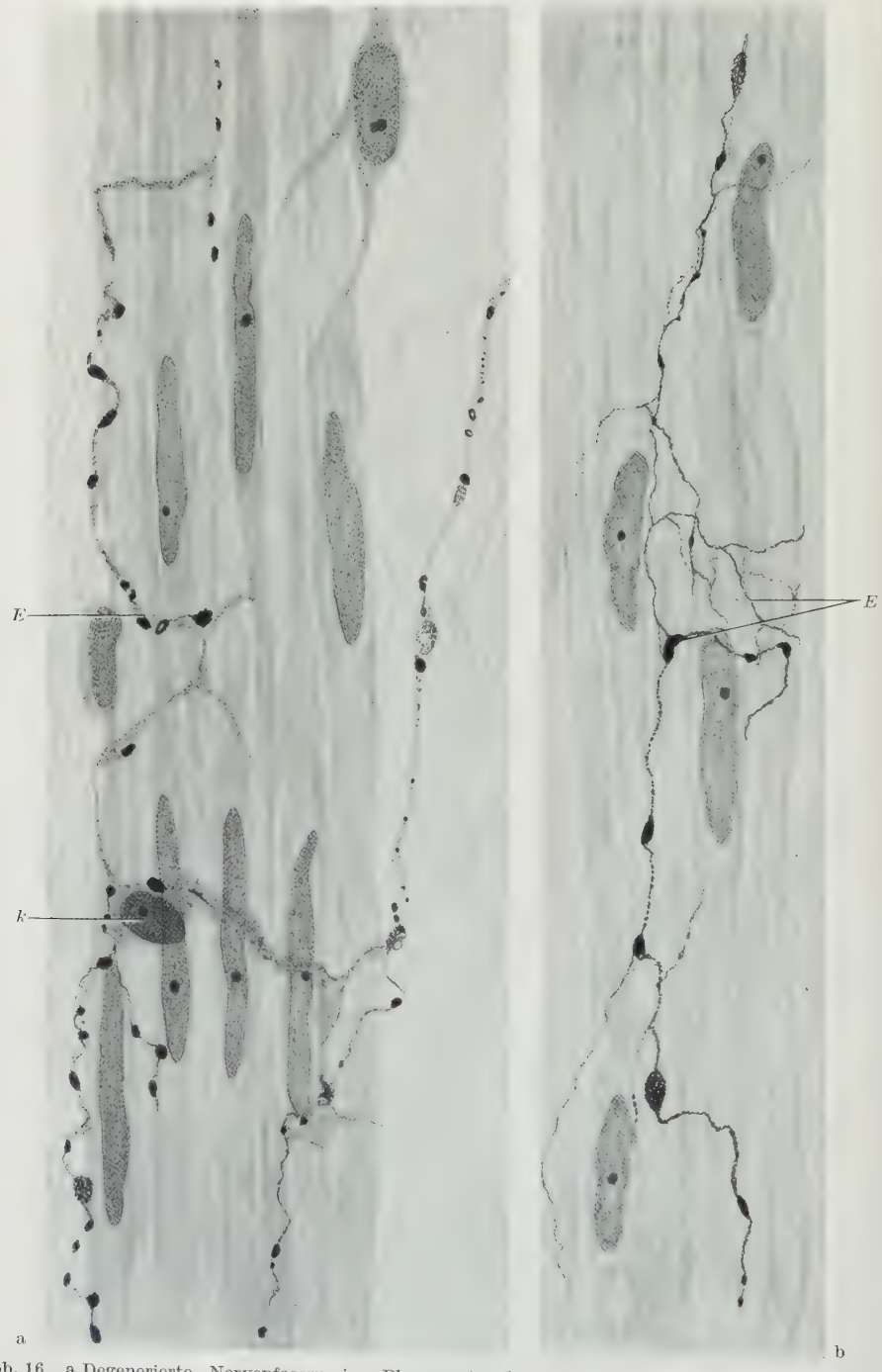


Abb. 16. a Degenerierte Nervenfasern im Plasmanetz der vegetativen Endformation auf der glatten Muskulatur. Nickhaut. Katze. Exstirpation des Ggl. cerv. sup. Silbercarbonattechnik nach JABONERO. Etwa 1800mal vergrößert. b Degenerierte Nervenfasern ohne granuliertes Trägerplasma an glatten Muskelzellen. Nickhaut. Katze. Exstirpation des Ggl. cerv. sup. Silbercarbonattechnik nach JABONERO. *E* Degenerierte Endformation, *k* rundlicher Kern im Plasmanetz

Sympathektomie nicht möglich, lediglich sympathische Fasern zur Degeneration zu bringen. Bullon und Stiefel haben ähnliche Untersuchungen durchgeführt und berichten von einer Degeneration der intramuskulären Nervennetze und von einem Faserzerfall bis in die feinsten Verzweigungen 72 Std nach Ganglionexstirpation. Die Autoren machen auch auf zwei verschieden gestaltete Endgebiete von Nervenfasern in der glatten Muskulatur der Nickhaut aufmerksam, die mir ebenfalls aufgefallen sind. Danach sollen die syncytial verknüpften Nervenfasern (Abb. 3 und 10) sympathischer, die unabhängig verlaufenden Fasern parasympathischer Natur sein. Nach eigenen Beobachtungen breitet sich außer der gewöhnlichen vegetativen Endformation ein System mit Endringen und Kolben versehener Nervenfasern auf der glatten Muskulatur der Nickhaut aus. Dieses erstreckt sich nicht in den granulierten Plasmaverband. Über einem möglichen morphologisch nachweisbaren getrennten Verlauf sympathischer und parasympathischer Elemente und mit unterschiedlichen Endigungstypen ausgestatteten Nervenfasern wird an anderer Stelle berichtet.

Der in Abb. 16a wiedergegebene Befund erbringt den morphologischen Nachweis einer Degeneration der bei stärkster lichtmikroskopischer Vergrößerung gerade noch erkennbaren Nervenfasern oder Fibrillen in der vegetativen Endformation. Man erkennt ohne Schwierigkeiten eine Unterbrechung der fädigen Elemente sowie ring- und knötchenartige Verdickungen, zum Teil noch im Verlauf der Nervenfasern, teilweise nur noch als Reste. Der bei *K* sichtbare, einen rundlich-ovalen Kern enthaltende Plasmaabschnitt würde als interstitielle Zelle zu bezeichnen sein. Die von ihren Ganglienzellen abgeschnittenen Neuriten fallen innerhalb eines granulierten kernhaltigen Plasmanetzes einer Degeneration anheim. In Abb. 16b kommen ebenfalls in einem degenerativen Zustand befindliche Nervenfasern zu Gesicht, die jedoch nicht in einem granulierten Plasma eingebettet sind. Man steht hier vor der Frage, ob das Fehlen des granulierten Leitgewebes auf die Imprägnation zurückzuführen ist oder ob es sich um lichtmikroskopisch erkennbare vegetative Endfasern ohne Hüllgewebe handelt. Da beide Befunde dem gleichen mit der Silbercarbonatmethode nach Jabonero angefertigten Präparat entnommen sind, ist die Ursache für ein Fehlen eines granulierten Trägerplasmas nicht in einer unzureichenden Technik zu suchen. Schwannsche Kerne, die auf die mögliche Anwesenheit eines Leitgewebes deuten könnten, sind ebenfalls nicht vorhanden. Vielleicht verlaufen die zur Rede stehenden Nervenfasern doch in einer Plasmamasse, die zu gering ist, um sich lichtmikroskopisch erfassen zu lassen. Es bleibt für unsere Fragestellung von untergeordneter Bedeutung, ob einzelne vegetative Nervenfasern der vegetativen Endformation auch außerhalb des granulierten Plasmanetzes verlaufen können, da auch die nach lichtmikroskopischen Resultaten als nackte Nervenfasern zu bezeichnenden Elemente degenerativen Veränderungen unterliegen.

Mit den erhaltenen Resultaten glaube ich den morphologischen Nachweis einer (nach cervicaler Sympathektomie) von den Neuriten der sympathischen Nervenzellen bis in die feinsten Ausläufer der vegetativen Endformation ablaufenden sekundären Degeneration erbracht zu haben. Die Resultate bestätigen teilweise die früheren Befunde Lawrentjews und Szentagothais. Die Vorstellungen Jaboneros über ein geschlossenes, von den postganglionären Nervenfasern zwar unabhängiges, aber von ihnen innerviertes System interstitieller

Zellen mit eigenen fibrillären Differenzierungsprodukten (distales nervöses Syncytium, nervöse Protoplasmabänder, Synapse auf Distanz) entbehren jeder morphologischen Grundlage und müssen daher aufgegeben werden. Die vom Autor früher nach cervicaler Sympathektomie geschilderte und abgebildete Unversehrtheit der vegetativen Endformation in der Nickhaut läßt sich mit eigenen Resultaten nicht vereinbaren und ist kürzlich von Jabonero (1961) selbst an Hand zahlreicher Abbildungen degenerierter vegetativer Endformationen korrigiert worden. Auf Grund meiner Untersuchungen läßt sich auch Jaboneros Auffassung einer sekretorischen Tätigkeit der vegetativen Endformation nicht zustimmen. Damit soll die Möglichkeit einer sekretorischen Tätigkeit der vegetativen Endformation nicht in Abrede gestellt werden, sondern die Auslegung einiger Strukturen in der vegetativen Endausbreitung im Sinne einer Sekretion kritisiert werden. Der Autor erblickt unter anderem im Auftreten von verschieden großen Silbergranula und Vakuolen im sympathischen Plasmaverband den morphologischen Ausdruck einer Neurosekretion. Da die Vakuolen im vegetativen Endgebiet unter dem Einfluß des Fixierungsmittels entstehen und im unfixierten Ehrlich-Präparat bei sorgfältiger Handhabung nicht auftreten, können sie nicht zur morphologischen Fundierung einer Neurosekretion herangezogen werden. Schon Lawrentjew betrachtet wie Boeke die Vakuolen als Kunstprodukte. Szentagothai hebt in Übereinstimmung mit eigenen Resultaten hervor, daß die Vakuolen nicht im granulierten Plasma, sondern in den Nervenfasern gelegen sind. Der Autor ist keineswegs von der Existenz der Vakuolen in der vegetativen Endformation aus unfixierten Präparaten überzeugt. Wenn man die entsprechenden Abbildungen Jaboneros (1955) genau durchmustert, so befinden sich die Vakuolen tatsächlich meistens im Verlauf der Nervenfasern und nur selten im Plasmanetz. Da der vegetativen Endformation spezifische Endigungstypen fehlen, spricht Jabonero von einer Synapse auf Distanz und meint, daß vom syncytialen Plasma ein chemischer Mediatstoff freigesetzt wird. Dieser gelange in die Gewebsflüssigkeit und könne von hier aus die Gewebsarten beeinflussen. Wenn auch besondere Nervenendigungen lichtmikroskopisch vorläufig nicht nachweisbar sind, so liegen nach Abb. 15 und 16 Teile der vegetativen Endformation dem nicht nervösen Erfolgsplasma doch sehr eng an. Ein degenerierter Strang der vegetativen Endformation schmiegt sich der Oberfläche glatter Muskelzellen an (Abb. 17), so daß von einer Synapse auf Distanz in diesem Falle keine Rede sein kann.

Die durch morphologisch-experimentelle Untersuchungen erhaltenen Resultate sind mit den Anschauungen Stöhrs, Reisers (1959), Boekes (1951), Jaboneros (1956) und Meyjlings zum großen Teil nicht vereinbar. Die von Stöhr (1957), Reiser (1959) und Boeke behauptete, aber von den Autoren nicht nachgewiesene plasmatische Verschmelzung von Nervengewebe und nicht nervösem Erfolgsplasma läßt sich morphologisch nicht begründen. Auch vermag man keine morphologischen Merkmale für die Unterstützung der Ansichten Jaboneros (1955) (Sekretion der vegetativen, nervösen Peripherie) und Meyjlings zu finden, nach denen das Endgebiet der vegetativen Nervenbahn aus einem von den postganglionären Nervenfasern innervierten, selbständigen System interstitieller Zellen mit echtem Neuroplasma und eigenen fibrillären Differenzierungen besteht. Szentagothai vertritt eine ähnliche Meinung, in der er

behauptet: „Wenn die fadenförmigen mit Silber imprägnierbaren Elemente der Terminalgeflechte ein inneres Differenzierungsprodukt der sog. protoplasmatischen Fasern wären, so wäre nicht einzusehen, wenn sie nach Durchtrennung der zuführenden Fasern degenerieren sollen, da ja die Kerne der protoplasmatischen Fasern oder interstitiellen Zellen erhalten bleiben." Die Ergebnisse eigener Durchschneidungsversuche legen ebenfalls den kontinuierlichen Weg der Neuriten

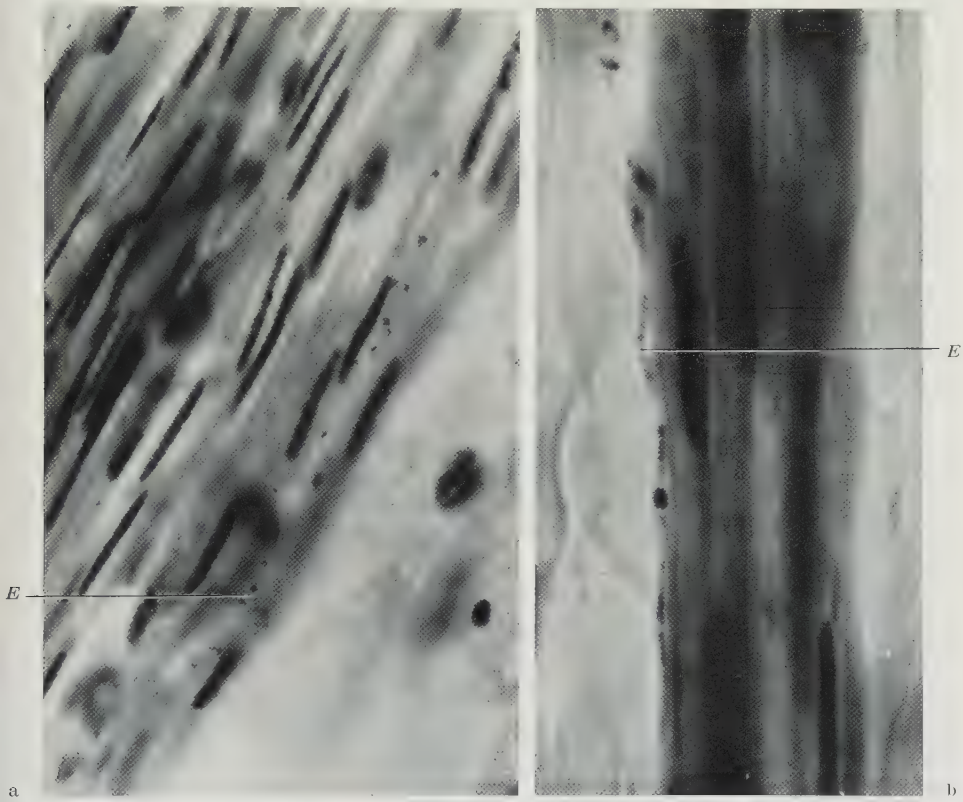


Abb. 17a u. b. Degenerierte Teile der vegetativen Endformation an glatten Muskelzellen. Nickhaut. Katze. Exstirpation des Ggl. cerv. sup. Silbercarbonattechnik nach Jabonero. a Etwa 750mal, b etwa 1700mal vergrößert. *E* Degenerierte Endformation

vegetativer Nervenzellen bis zum Erfolgsplasma dar. Die von den genannten Autoren benutzten Bezeichnungen „Terminalreticulum", „Synapse auf Distanz", „System der Protoplasmafasern", „System der interstitiellen Zellen", „Sympathischer Grundplexus", „Periterminales Netzwerk", die das Ende der vegetativen postganglionären Nervenbahn kennzeichnen, sollte man daher in Zukunft durch den Namen „Vegetative Endformation" ersetzen. Danach verkörpert die gesamte vegetative Endformation die Endabschnitte der vegetativen postganglionären Nervenfasern, die unabhängig voneinander oder aus den zitierten Gründen nur vorgetäuscht netzartig in einem mit länglichen und rundlichen Kernen ausgestatteten anscheinenden Plasmanetz granulärer Natur verlaufen. Die Frage, ob das Leitgewebe ein synaptisches Plasma (Jabonero 1961) oder Lemnoblasten (Lawrentjew) darstellt, in denen die Endverzweigungen

postganglionärer Nervenfasern einherziehen, kann vorerst nicht sicher beantwortet werden. Spezifische Endigungstypen wie an präganglionären Nervenfasern (Kolben, Schlingen, Ösen) kommen nach lichtmikroskopischen Resultaten an den Fasern der vegetativen Endformation nicht vor. Da sich die vegetative Endformation einmal lediglich in Nähe der Erfolgszellen ausbreitet, andererseits den Erfolgszellen dicht anliegt, sollte man die Entscheidung, ob synaptische Verbindungen des vegetativen Nervensystems vorliegen oder nicht, elektronenmikroskopischen Ergebnissen überlassen. Durch lichtmikroskopische Untersuchungen läßt sich lediglich eine Anlagerung der vegetativen Endformation an die Erfolgszellen nachweisen. Bei einer klaren Darstellung der vegetativen, nervösen Endgebiete mit verschiedenen histologischen Techniken und gleichzeitiger morphologisch-experimenteller Untersuchung *wird der neuronale Aufbau auch des vegetativen Nervensystems deutlich.*

Zusammenfassung

Auf Grund lichtmikroskopischer Untersuchungen mit verschiedenen histologischen Techniken läßt sich das Endgebiet der postganglionären Nervenbahn folgendermaßen definieren: Die vegetative Endformation baut sich aus den Endabschnitten der postganglionären Nervenfasern und aus einem kernhaltigen, granulierten Plasmanetz auf. Teilweise ist eine enge Anlagerung der Endformation an die Erfolgszellen zu beobachten; eine Verschmelzung beider Gewebsarten ist nicht feststellbar. Besondere Endigungstypen fehlen. Auch lassen sich keine sicheren Anzeichen einer sekretorischen Tätigkeit der Endformation nachweisen. Die Möglichkeit einer vorgetäuschten Netzbildung der Nervenfasern und Fibrillen wird diskutiert.

Da nach Durchtrennung der postganglionären Nervenfasern die Nervenelemente der vegetativen Endformation degenerieren, müssen die Anschauungen Jaboneros (1956) und Meyjlings über ein unabhängiges System interstitieller Zellen, das von postganglionären Nervenfasern innerviert wird, aufgegeben werden. Im Gegensatz zu Stöhrs (1957) und Reisers (1959) deskriptiven Untersuchungen einer syncytialen Bauweise des vegetativen Nervensystems zeigen die morphologisch-experimentellen Resultate dessen *neuronale Gliederung* auf.

Literatur

Abraham, A.: Über die mikroskopische Innervation der Gaumenschleimhaut der Frösche. Z. Zellforsch. **27**, 745—753 (1938).
— Die Innervation des Darmkanals der Gastropoden. Z. Zellforsch. **30**, 273—296 (1940a).
— Die Struktur des Ganglion coeliacum beim Menschen. Allaz. Közlem **37**, 154—163 (1940b).
— Gibt es Nervennetze? Z. Zellforsch. **30**, 321—322 (1940).
— Die Innervierung der Blutgefäße. Ann. biol. Univ. Szeged **1**, 219—235 (1951).
Boeke, J.: Die morphologische Grundlage der sympathischen Innervation der quergestreiften Muskelfasern. Z. mikr.-anat. Forsch. **8**, 561—639 (1927).
— The nature of the interneuronal connections (synapses). Proc. kon. ned. Akad. Wet. **32**, 683—691 (1929).
— De- und Regeneration des peripheren Nervensystems. Dtsch. Z. Nervenheilk. **115**, 160—197 (1930).
— Some remarks on the efferent innervation of the blood-vessels. Proc. kon. ned. Akad. Wet. **35**, 812—818 (1932).
— The autonomic nervous system of Amphioxus lanceolatus. Proc. kon. ned. Akad. **36**, 864—868 (1933).

Boeke J.: Innervationsstudien. I. u. II. Z. mikr.-anat. Forsch. **33**, 23—90 (1933).
— Innervationsstudien. VI. Z. mikr.-anat. Forsch. **35**, 551—601 (1934).
— Innervationsstudien. VII. Z. mikr.-anat. Forsch. **38**, 554—593 (1935a).
— Innervationsstudien. VIII. Z. mikr.-anat. Forsch. **38**, 594—618 (1935b).
— Die periphere Endausbreitung des sympathischen Systems. Nova Acta Leopold. **2**, 209—257 (1935c).
— Innervationsstudien. IX. Z. mikr.-anat. Forsch. **39**, 477—520 (1936).
— Sympathetic groundplexus and reticuline fibres. Anat. Anz. **86**, 150—162 (1938a).
— Über die Verbindung der Nervenzellen untereinander und mit den Erfolgsorganen. Anat. Anz. **85**, Erg.-H. 111—141 (1938b).
— Innervationsstudien. X. Z. mikr.-anat. Forsch. **46**, 488—519 (1939).
— The sympathetic endformation, its synaptology, the interstitial cells, the periterminal network and its bearing on the neurone theory. Discussion and critique. Acta anat. (Basel) **8**, 18—61.
— Sympathischer Grundplexus contra Terminalreticulum. Acta neuroveg. (Wien) **2**, 32—40 (1951).
Bullon, A., and E. Stiefel: Über die efferente Innervation der glatten Muskulatur. Acta neuroveg. (Wien) **12**, 375—388 (1955).
Bullon Ramirez, A.: Experimentelle Studien über die Innervation der kleinen Blutgefäße. Acta neuroveg. (Wien) **14**, 132—147 (1956).
Caesar, R.: Elektronenmikroskopische Beobachtungen zum Verhalten der marklosen Nervenfasern im glatten Muskelgewebe. Anat. Anz. Erg.-H. zu Bd. **105**, 90—100 (1958).
— G. A. Edwards and H. Ruska: Architecture and nerve supply of mammalian smooth muscle tissue. J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 876—877 (1957).
Cajal, R. y.: Neue Darstellung vom histologischen Bau des Zentralnervensystems. Arch. Anat. u. Physiol., Anat. Abt. 319—428 (1893).
— Die Struktur des nervösen Protoplasmas. Mschr. Psychiat. Neurol. **1**, 156—210 (1897).
— Die histologischen Beweise der Neuronentheorie von His und Forel. Anat. Anz. **30**, 113—144 (1907).
— Degeneration and regeneration in the nervous system, vol. 2. Oxford University Press 1928.
— Les preuves objectives de l'unité anatomique des cellules nerveuses. Trab. Lab. Invest. biol. Univ. Madrid **29**, 1—137 (1934).
— Die Neuronenlehre. In: Handbuch der Neurologie, Bd. 1, S. 887—994. Berlin: Springer 1935.
Campenhout, E. van: L'innervation des vaissaux sanguins de l'intestin. Acta neuroveg. (Wien) **14**, 34—45 (1956).
Coronini, C.: Zit. in VI. Neurovegetatives Symposion, Strasbourg. Acta neuroveg. (Wien) **13**, 322 (1956). VII. Neurovegetatives Symposion, Genf. Acta neuroveg. (Wien) **15**, 181 (1956).
Feindel, W. H., D. C. Sinclair and G. Weddell: A new method for investigating the nervous system. Brain **70**, 495—506 (1947).
Feyrter, F.: Über die Pathologie der vegetativen nervösen Peripherie und ihrer ganglionären Regulationsstätten. Wien: Wilhelm Maudrich 1951.
Gansler, H.: Phasenkontrast- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Innervation der glatten Muskulatur. Acta neuroveg. (Wien) **22**, H. 3 (1960).
Genis, J. M., y C. D. Clemente: Análisis comparativo de la inervación del músculo liso de la membrana nictitante y del músculo ciliar. Estudio experimental tras la exstirpación del ganglio cervical superior. Arch. esp. Morf. **13**, 159 (1957).
Gerlach, L.: Über die Nervenendigungen in der Muskulatur des Froschherzens. Virchows Arch. path. Anat. **36**, 3—39 (1876).
Haferkamp, O.: Eine neue Färbung zur Darstellung der cytoplasmatischen Formation im Bindegewebe und der nervösen Peripherie. Acta neuroveg. (Wien) **19**, 138—145 (1959).
Hager, H., u. W. L. Tafuri: Elektronenoptische Untersuchungen über die Feinstruktur des Plexus myentericus (Auerbach) im Colon des Meerschweinchens (Cavia cobaya). Arch. Psychiat. Nervenkr. **199**, 437—471 (1959).
Herzog, E.: Erkrankungen des vegetativen Nervensystems. In: Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie, Bd. 13, Teil 5. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.

Hilgenberg, F.: Neurohistologische Studien über die Pressorezeptoren des Carotissinus bei Hypertonikern. Acta neuroveg. (Wien) **19**, 1—14 (1959).

Hillarp, N. A.: Structure of the synapse and the peripheral innervation apparatus of the autonomic nervous system. Acta anat. (Basel) **2**, Suppl. **4**, 1—153 (1946/47).

Iljina, W. J., u. B. J. Lawrentjew: Experimentell-morphologische Studien über den feineren Bau des autonomen Nervensystems. Z. mikr.-anat. Forsch. **30**, 543—550 (1932).

Jabonero, V.: Etudes sur le système neurovégétatif périphérique. I. Structure des fibres nerveuses. Acta anat. (Basel) **6**, 14—54 (1948).

– Etudes sur le système neurovégétatif périphérique. IV. Innervation de la vesicule biliaire humaine. Acta anat. (Basel) **13**, 171—192 (1951).

— Etudes sur le système neurovégétatif périphérique. V. Innervation de l'oesophage humain. Nouveaux faits concernant la constitution du S.N.V. et de ses synapses. Acta anat. (Basel) **15**, 105—142 (1952a).

— Etudes sur le système neurovégétatif périphérique. VI. Les synapses. Acta anat. (Basel) **15**, 329—392 (1952b).

— Etudes sur le système neurovégétatif périphérique. VII. Le syncycitum nerveux distal de l'uterus humain. Acta anat. (Basel) **18**, 295—325 (1953a).

— Der anatomische Aufbau des peripheren, neurovegetativen Systems. Acta neuroveg. (Wien) Suppl. **4**, 1—159 (1953b).

— Innervation efférente du sein humain. Acta neuroveg. (Wien) Sonderabdr. aus Bd. **6**, 243—272 (1953c).

— Die interstitiellen Zellen des vegetativen Nervensystems und ihre vermutliche Analogie zu anderen Elementen. I. Acta neuroveg. (Wien) **5**, 1—24 (1953). II. Acta neuroveg. (Wien) **5**, 266—280 (1953d).

— Die anatomischen Grundlagen der peripheren Neurosekretion. Acta neuroveg. (Wien) Suppl. **6** (Colloquium), 160—302 (1955e).

— Etudes sur les synapses du système neurovégétatif périphérique. I. Les synapses dans les ganglions sympathiques. Z. mikr.-anat. Forsch. **61**, 360—419 (1955b).

— Studien über die Synapsen des peripheren vegetativen Nervensystems. III. Das distale nervöse Syncytium und die plexiforme Synapse auf Distanz. Z. mikr.-anat. Forsch. **62**, 407—450 (1956).

— Mikroskopische Studien über die Innervation des Verdauungsaktes. I. Oesophagus. Acta neuroveg. (Wien) **17**, 308—353 (1958).

— Mikroskopische Studien über die Morphologie und die Morphopathologie der vegetativen Innervation der menschlichen Haut. I. Acta neuroveg. (Wien) **18**, 68—154 (1958). II. Acta neuroveg. (Wien) **18**, 354—387 (1958).

— Über die normale und pathologische Histologie der Innervation des Kehlkopfes. Z. mikr.-anat. Forsch. **64**, 364—416 (1958).

— Die plexiforme Synapse auf Distanz und die Bedeutung der sogenannten intercalären Zellen. Acta neuroveg. (Wien) **19**, 276—302 (1959).

— Über die feinere Innervation der menschlichen Gallenblase. Acta neuroveg. (Wien) **20**, 109—154 (1959).

— P. Gomez Bosque, F. Bordallo u. Perez Casas: Der anatomische Aufbau des peripheren neurovegetativen Systems. Wien: Springer 1953.

– R. Lopez Prieto, A. Perez Casas u. M. E. Bengoechea: Neue Beobachtungen über die Endigungsweise der efferenten vegetativen Nervenbahnen. Z. mikr.-anat. Forsch. **67**, 1—103 (1961).

Kirsche, W.: Phasenkontrastuntersuchungen über die Brauchbarkeit der Formalinfixierung für Silberimprägnationsmethoden am Nervengewebe. Z. mikr.-anat. Forsch. **61**, 167 –182 (1955).

— Die Neuronentheorie. Münch. med. Wschr. **102**, 2266—2274 (1960).

Kiss, F.: Zit. in V. Jabonero, Efferente Innervation der Blutgefäße. Acta neuroveg. (Wien) **14**, 29—32 (1956).

Knoche, H.: Über die feinere Innervation der Niere des Menschen. I. Z. Anat. **115**, 97—114 (1950).

– Über die feinere Innervation der Niere des Menschen. II. Z. Zellforsch. **36**, 448—475 (1951).

Knoche, H.: Über die feinere Innervation der Arteria uterina des Menschen. Z. Zellforsch. **37**, 205—239 (1952a).
— Zum Problem der intercalären Zellen. Acta neuroveget. (Wien) **4**, 177—178 (1952b).
— Untersuchungen über die Endigungsweise cerebrospinaler und vegetativer Nervenfasern. Z. Zellforsch. **40**, 162—198 (1954a).
— Degenerative Veränderungen des vegetativen Nervensystems in der Glatzenhaut. Arch. Derm. Syph. (Berl.) **197**, 505—512 (1954b).
— Zur feineren Innervation des Thymus vom Menschen. Z. Zellforsch. **41**, 556—593 (1955a).
— Untersuchungen über die nervöse Versorgung der Eizelle. Acta neuroveget. (Wien) **10**, 502—512 (1955b).
— Morphologisch-experimentelle Untersuchungen über eine Faserverbindung der Retina mit den vegetativen Zentren des Zwischenhirnes und mit der Hypophyse. Z. Zellforsch. **45**, 201—264 (1956).
— Beitrag zum Bau der neurovegetativen Endformation. Z. mikr.-anat. Forsch. **64**, 110—118 (1958a).
— Untersuchungen über die feinere Innervation arterio-venöser Anastomosen. I. Z. Anat. Entwickl.-Gesch. **120**, 379—391 (1958b).
— Beitrag zum Bau der neurovegetativen Endformation. Z. mikr.-anat. Forsch. **64**, 110—118 (1958c).
— Ursprung, Verlauf und Endigung der retino-hypothalamischen Bahn. Z. Zellforsch. **51**, 658—704 (1960).
Lawrentjew, B. I.: Über die Erscheinungen bei Degeneration und Regeneration im sympathischen Nervensystem. Z. mikr.-anat. Forsch. **2**, 201—223 (1925).
— Über die Verbreitung der nervösen Elemente (einschließlich der interstitiellen Zellen Cajals) in der glatten Muskulatur. Z. mikr.-anat. Forsch. **6**, 467—488 (1926).
— Experimentell-morphologische Studien über den feineren Bau des autonomen Nervensystems. Z. mikr.-anat. Forsch. **18**, 232—262 (1929).
— Zur Lehre von der Cytoarchitektonik des peripheren autonomen Nervensystems. I. Z. mikr.-anat. Forsch. **23**, 527—551 (1931).
— Experimentell morphologische Studien über den feineren Bau des autonomen Nervensystems. IV. Z. mikr.-anat. Forsch. **35**, 71—118 (1934a).
— Einige Bemerkungen über Fortschritte und Aufgaben der Erforschung des autonomen Nervensystems. Z. mikr.-anat. Forsch. **36**, 651—659 (1934b).
—, u. A. J. Borowskaja: Die Degeneration der postganglionären Nervenfasern des autonomen Nervensystems und deren Endigungen. Z. Zellforsch. **23**, 761—778 (1936).
Llombart, A., y E. Fornes: Caracteristicas del simpático del iris. Arch. Soc. oftal. hisp.-amer. **13**, 1107 (1953).
— Lesiones degenerativas del simpático periférico del limbo ocular, provocadas por la resección del ganglio simpático cervical superior. Arch. esp. Morf. **10**, 163 (1953).
Meyling, H. A.: Das periphere Nervennetz und sein Zusammenhang mit den ortho- und parasympathischen Nervenfasern. Acta neuroveget. (Wien) Suppl. **6**, 35—63 (1955).
Millen, J. W.: Observations on the innervation of blood vessels. J. Anat. (Lond.) **75**, 50—63 (1940).
Nelemans, F. A., and J. Dogterom: Structure and function of the peripheral autonomic nervous system. Acta neuroveg. (Wien) Suppl. **6**, 101—121 (1955).
Nonidez, J. F.: The nervous „terminal reticulum". A critique I. Observations on the innervation of the blood vessels. Anat. Anz. **82**, 1—13 (1937).
— III. Observations on the autonomic ganglia and nerves with special reference to the problem of the neuro-neuronal synapse. Concluding remarks. Anat. Anz. **84**, 315—330 (1937).
Reiser, K. A.: Der Nervenapparat im Processus vermiformis nebst einigen Bemerkungen über seine Veränderungen bei chronischer Appendicitis. Z. Zellforsch. **15**, 761—800 (1932).
— Über die Endausbreitung des vegetativen Nervensystems. Z. Zellforsch. **17**, 610—641 (1933).
— Über die Nerven der Darmmuskulatur. Z. Zellforsch. **22**, 675—693 (1935).
— Über die Innervation der Hornhaut des Auges. Arch. Augenheilk. **109**, 251—280 (1936a).
— Über die Innervation der menschlichen Sklera. Arch. Augenheilk. **109**, 481—496 (1936b).

Reiser, K. A.: Veränderungen am Hornhautnervenapparat des Kaninchens nach Exstirpation des Ganglion Gasseri. Heidelberger Ber. **51**, 287—292 (1936c).
— Die Veränderungen am Hornhautnervenapparat usw. Arch. Augenheilk. **110**, 253—283 (1937).
— Die Neuronenlehre im Lichte neuerer histologischer Forschung. Dtsch. med. Wschr. **1938**, 487.
— Zur Lehre vom Feinbau der nervösen Substanz. Z. ges. Neurol. Psychiat. **175**, 485—651 (1943).
— Die Entwicklung unserer Anschauung über das Nervensystem. Klin. Mbl. Augenheilk. **110**, 600—605 (1944).
— Bemerkungen zum Feinbau der vegetativ-nervösen Peripherie. Acta neuroveg. (Wien) **4**, 179—187 (1952).
— Das Verhalten der Hornhautnerven bei der Transplantation. Heidelberger Ber. **50**, 241—245 (1955).
— Mikroskopische Anatomie des Menschen, Bd. 4. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1959.

Riegele, L.: Die Bedeutung des reticulo-endothelialen Syncytiums als Scheidenplasmodium des fibrillären, nervösen Endnetzes in Leber, Milz und Nebenniere. Z. Zellforsch. **15**, 311—330 (1932a).
— Beitrag zur Kenntnis des Scheidenplasmodiums im autonomen Nervensystem. Z. Zellforsch. **15**, 374—379 (1932b).

Schimert, J.: Untersuchungen über den Ursprung und die Endausbreitung der Nerven der Iris. Z. Zellforsch. **25**, 247—258 (1937a).
— Die Nervenversorgung des Myocards. Z. Zellforsch. **27**, 246—266 (1937).
— Experimentelle Untersuchungen über die transneurale Degeneration. Anat. Anz. **83**, Erg.-H. 148—152 (1937b).
— Die „Syncytielle Natur" des vegetativen Nervensystems. Z. mikr.-anat. Forsch. **44**, 85—118 (1938).

Stöhr jr., Ph.: Das periphere Nervensystem. In Handbuch der mikroskopischen Anatomie, Bd. IV, S. 202—447. Berlin: Springer 1928.
— Mikroskopische Studien zur Innervation des Magen-Darmkanals. Z. Zellforsch. **12**, 66—154 (1930).
— Mikroskopische Studien zur Innervation des Magen-Darmkanals. II. Über die Nerven des menschlichen Magens und ihre Veränderungen beim Ulcus. Z. Zellforsch. **16**, 123—197 (1932).
— Mikroskopische Beobachtungen über die Nerven der Blutgefäße. Forsch. Fortschr. dtsch. Wiss. **9** (1933a).
— Mikroskopische Anatomie der Gefäßnerven. Verh. Dtsch. Ges. Kreislaufforsch., 6. Tagg, 1933b.
— Zur Nervenversorgung der Blutgefäße. Dtsch. med. Wschr. **1933 II**c, 1625.
— Mikroskopische Studien zur Innervation des Magen-Darmkanals. III. Z. Zellforsch. **21**, 243—278 (1934a).
— Anatomische Betrachtungen über das vegetative Nervensystem und seine Veränderungen beim Magenulcus. Dtsch. med. Wschr. **1934 I**b, 45—49.
— Mikroskopische Beobachtungen des Magens beim Ulcus chronicum. Virchows Arch. path. Anat. **292**, 595—626 (1934c).
— Beobachtungen und Bemerkungen über die Endausbreitung des vegetativen Nervensystems. Z. Anat. Entwickl.-Gesch. **104**, 133—158 (1935).
— Mikroskopische Studien zur Innervation des Magen-Darmkanals. IV. Z. Zellforsch. **27**, 341—392 (1937).
— Die mikroskopische Innervation der Blutgefäße. Ergebn. Anat. Entwickl.-Gesch. **32**, 1—62 (1938).
— Zusammenfassende Ergebnisse über die normale und pathologische Histologie der sympathischen Ganglienzellen und der Endapparate im vegetativen Nervensystem. Ergebn. Anat. Entwickl.-Gesch. **33**, 135—284 (1941).
— Studien zur normalen und pathologischen Histologie vegetativer Ganglienzellen. I. Z. Zellforsch. **32**, 587—635 (1943).

Stöhr, jr. Ph. Über pathologisch-anatomische Veränderungen am Halsgrenzstrang bei Bronchialasthma. Allg. path. Schriftenreihe **1943**, H. 3/4, 1—14.
— Zur pathologischen Anatomie des vegetativen Nervensystems. Dtsch. med. Wschr. **1947**, 305.
— Mikroskopische Studien zur Innervation des Magen-Darmkanales. V. Z. Zellforsch. **34**, 1—54 (1947).
— Bemerkungen über die Endigungsweise des vegetativen Nervensystems und über den Aufbau des Organismus. Acta neuroveget. (Wien) **1**, 74—86 (1950).
— Lehrbuch der Histologie. Heidelberg-Berlin-Göttingen: Springer 1951.
— Zusammenfassende Ergebnisse über die mikroskopische Innervation des Magen-Darmkanales. Ergebn. Anat. Entwickl.-Gesch. **34**, 250—401 (1952).
— Mikroskopische Anatomie des vegetativen Nervensystems. In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Erg. zu Bd. IV/1. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1957.
— Die Degeneration und Regeneration des vegetativen Nervensystems im menschlichen Megacolon nach operativen Eingriffen. Dtsch. Z. Nervenheilk. **181**, 371—394 (1960).
Sunder-Plassmann, P.: Sympathicuschirurgie. Stuttgart: Georg Thieme 1953.
Szentgothai, J.: Einige Bemerkungen zur Struktur der peripheren Endausbreitung vegetativer Nerven. Acta neuroveget. (Wien) **15**, 417—445 (1957).
Taubert, J.: Die Plasmastruktur vegetativ-nervöser Endformationen im nativen Einschlußpräparat. Acta neuroveget. (Wien) **22**, 71—98 (1960).
Walter, P.: Das morphologische Verhalten vegetativ-nervöser Elemente im Duodenum des Rindes. Acta neuroveget. (Wien) Sonderabdr. aus Bd. **15**, H. 1—2 (1956).
— Das morphologische Verhalten vegetativ-nervöser Elemente im Duodenum des Rindes. Acta neuroveget. (Wien) **15**, 79—100 (1957).
— Über das Auftreten von Vakuolen in peripheren vegetativen Nervenfasern bei nativer Einschlußfärbung. Acta neuroveget. (Wien) **15**, 215—222 (1957).
— Die vegetativ-nervöse Peripherie und ihre Darstellungsmöglichkeiten an Material von Haustieren. Zbl. Vet.-Med. **5**, 692—741 (1958).
— Die feinere Innervation der Cervix uteri des Rindes. Verh. anat. Ges. (Zürich) Erg.-Bd. **106/107**, 273—286 (1959).
—, u. J. Taubert: Zur Frage der Cytoplasmaqualitäten auf der vegetativ-nervösen Endstrecke. Z. Zellforsch. **46**, 1—11 (1957).
Weber, A.: Différenciation de cellules dites „interstitielles" dans le plexus nerveux intestinaux, chez l'embryon de cobaye. Acta neuroveget. (Wien) Suppl. **6**, 18—30 (1955).
Yoshitoshi, T.: Experimentelle Untersuchungen über sekretorische Verhältnisse des operierten Magens. J. orient. Med. **27**, 753—766 (1937).

Privatdozent Dr. Hermann Knoche, Anatomisches Institut der Universität Münster (Westfalen), Vesaliusweg 2—4

Zeitschrift für Zellforschung 55, 556—565 (1961)

Division of Biological and Medical Research, Argonne National Laboratory
Argonne, Illinois, USA

SYNAPTINEMAL COMPLEXES IN PRIMARY SPERMATOCYTES OF THE MOUSE: THE EFFECT OF ELEVATED TEMPERATURE AND SOME OBSERVATIONS ON THE STRUCTURE OF THESE COMPLEXES IN CONTROL MATERIAL*

By

B. R. Nebel** and E. M. Hackett

With 4 Figures in the Text

(Received June 12, 1961)

Synaptinemal complexes were first seen by Moses (1956) in crayfish and grasshopper and almost simultaneously reported by Fawcett (1956) in pigeon, cat and man. The subject has recently been well reviewed by Kaufmann, Gay and McDonald (1959). According to Moses (1958) the synaptinemal complex, which appears during meiotic prophases in higher animals and plants, consists of "three filamentous elements, parallel, uniformly spaced and arranged in a single plane to form a ribbon. The lateral elements which are symmetrical are usually denser and larger than the central one which is often evanescent ... the complex (or 'core') lies embedded in the axis of the chromosome (actually a bivalent ...) and is integral with the surrounding Feulgen-positive material ...". A little later Nebel (1959b) found that the synaptinemal complexes of the mouse are not seriously affected by acute exposures to X-rays (1000 r). In this, the first statistical study, it was shown that in random electron microscope photographs the length of the complexes decreases by 39 per cent between early zygotene and pachytene. A complete tripartite complex was called a "double core". Single cores represent a single lateral component of the complex, obviously corresponding to a univalent chromosome. It was found that the proportion of "singles" decreased from leptotene to pachytene, when pairing reaches a maximum. In agreement with this are the observations of Charard (1959) of single cores in orchids. These he interprets as being the dense osmiophilic regions of univalent chromosomes which later in synapsis form the complete synaptinemal complexes.

In the following year Sotelo and Trujillo-Cenóz (1960) published an extensive study of the morphogenesis of chromosomes in the meiosis of *Grillus*, *Laplatacris* and *Blaptica*. Several new terms were introduced: S.E.T., single elementary thread, corresponds to the single core of Nebel or the single lateral component of the complex of Moses. P.T.G., or primary tripartite group, corresponds to the double core or the synaptinemal complex proper. Sotelo and Trujillo-Cenóz (1960) also showed the medial component of tripartite groups in *Blaptica dubia* to be double and occasionally multi-stranded in certain regions which are called puffy. These authors observed spermatid nuclei of *Blaptica* and

* This work was performed under the auspices of the U.S. Atomic Energy Commission.
** Dedicated to Professor Franz Schrader on the occasion of his 70th birthday.

Grillus to contain synaptinemal complexes which occurred sometimes singly and sometimes in groups side by side. In the latter case a group of 2 complexes arranged side by side showed only 5 individual tracks due to the apparent fusion of adjacent lateral elements; a group of 3 complexes thus showed only 7 tracks. In contrast to all other authors SOTELO and TRUJILLO-CENÓZ (1960) suggest that a P.T.G., that is, a synaptinemal complex, represents a univalent not a bivalent chromosome.

The present study was undertaken to investigate the occurrence and structure of synaptinemal complexes and the relationship of single and double cores to the pairing of chromosomes. We have traced their origin and disappearance relative to the meiotic stage. Also we have observed the action of elevated temperature on the synaptinemal complexes and by observing the prolonged aftereffect of elevated temperature we were led to appreciate at least one feature of chromosome pairing of which we were not previously aware.

In addition, the findings of WILSON (1959) with the light microscope concerning the effect of heat on chiasma frequency suggested to us the combination of heat treatment and electron microscopic examination of synaptinemal complexes. If after heat treatment the frequency of "singles" should be found greater than in corresponding stages of non-treated material the assumption that the cores are the essential organelles of pairing would be further strengthened.

A. Materials and Methods

Twenty C57 B1 male mice at least 100 days old were exposed to an environment of 34.5°C and 60 per cent humidity for $76^1/_2$ hours. Four control mice were maintained in the usual controlled environment in the animal quarters (22°C, 60% humidity). Sacrifices were made during exposure and at 11, 14, and 19 days after termination of the exposure. The testes were fixed in Dalton's modification of Altmann's fixative, embedded in methacrylate (40% ethyl and 60% butyl methacrylate) and sectioned with a Porter-Blum microtome set at 3/40 μ. The sections were stained for 1 hour with 2% uranyl acetate to increase contrast.

In the electron microscope we ascertained the tubular stage of a section by inspecting the spermatids according to the scheme of OAKBERG (1956). For the convenience of the reader a brief chart of the spermatogenic stages as they refer to meiosis in the male mouse is given. Roman numerals indicate stages. Arabic numerals refer to the spermiogenic stage.

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
A	AB	Int	B	B	B	"resting"		leptotene		zygotene	
pachytene									dipl	diak	MI, MII
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	14	14	15	15	15	16	16				

Thus, if the electron microscope section contains stage 8 and 16 spermatids, it is labeled stage VIII and the spermatocytes of the younger generation are by definition in early leptotene.

B. Observations

I. Synapsis

The findings of this study are summarized in the Table. The figures in this table are of two kinds. Cores/cell is the result of counting all available cores from all sections of meiotic cells cut equatorially or nearly so and dividing the sum by the number of cells used. Values for single cores are expressed as percentages of the total number of cores. One finds the stage VIII-X spermatocytes to contain few thin cores with a ratio of 24% single to 76% double. There is thus a slight

discrepancy between the classical picture of leptotene and what one sees in the electron microscope. Leptotene in the electron microscope is the stage in which the cores first appear and although they are indeed very slender (leptos), they are not all single as the classical concept would demand.

In the control material we were able to find cores in every stage of the cycle, that is, from stage VIII thru XII of the early cycle and from stage I to X of the second cycle. For the heat-treated material we were unable to obtain representation at all stages because electron microscopy imposes a limit on the amount of material which can be reasonably handled. Concerning the figures of the Table the average number of cells used for each entry is 12. The actual cell numbers vary from 3 to 44. We refrained from statistical tests of significance since the present study is considered qualitative in nature.

Table. *Synaptinemal complexes of adult male mice in control and in heat-treated material*
Cores per cell represents the average total number of complexes (single plus double) observed. Single cores, % refers to the sum of single complexes expressed as percentage of the total.

Meiotic stage and spermatogenic stages	Control		Heat-Treated									
			28½ hr		52½ hr		76½ hr 11 days recovery		76½ hr 14 days recovery		76½ hr 19 days recovery	
	Cores per cell	Single cores, %	Cores per cell	Single cores, %	Cores per cell	Single cores, %	Cores per cell	Single cores, %	Cores per cell	Single cores, %	Cores per cell	Single cores, %
Leptotene + early zytogene (VIII—X)	2.0	24.4	3.0	75.0	1.3	85.7	0.0	—	2.3	28.6	—	—
Zytogene (XI—XII)	6.1	2.9	3.6	24.1	2.0	75.0	—	—	—	—	4.6	2.4
Pachytene (I—II)	6.3	0.9	2.5	10.0	—	—	—	—	5.0	0.0	—	—
Pachytene (III—VII)	6.5	0.7	4.2	8.7	3.6	35.9	—	—	4.3	4.6	4.5	11.1
Pachytene (VIII—X)	3.9	1.3	—	—	2.1	16.0	2.0	41.7	—	—	—	—

Table, Column 1, Control, reflects the fact that in the mouse the cores appear rather suddenly — during stages VIII to X. With the light microscope we have also observed that true unpaired leptotene in the mouse is of short duration and not too well defined cytologically. Likewise cores disappear abruptly and completely in late pachytene, stages VIII to X of the next cycle. Thus it would have been correct to have added a zero for cores in pre-leptotene and earliest leptotene and likewise for late pachytene and diplotene — stages VI and VII for the young generation of spermatocytes and X to XI for the older generation.

The data show that when cores first appear in the cells of control mice 75% are already paired. With the close of stage X the average number of total cores in our sections rises abruptly to 6 per cell and remains reassuringly constant thru stage VII, after which a steep decline begins. In the mouse it is shown that pairing is rapid and practically complete. Single cores drop from 24 thru 3 to less than 1 per cent of the totals during stages X to I.

The effects of temperature on synapsis in heat-treated material are in the terms of our experiment immediate, decisive and apparently long-lasting. In the column describing the results from sacrifices after $28^1/_2$ hours of 34.5°C and 60% humidity the total core number is depressed at all stages except one; the percentage of single cores is markedly increased throughout. This change is even more marked after $52^1/_2$ hours of heat. The recovery data in the following columns show that complete recovery is not obtained even after maintaining the animals for 19 days at normal conditions (22°C and 60% humidity).

Critical evaluation of the results from heat treatment leads to at least four conclusions,

1. Elevated temperature must be capable of destroying preformed cores. This follows from inspection of the depressed figures in the column marked "$28^1/_2$ hours heat, Cores/cell".

2. Elevated temperature gives rise to some induced secondary asynapsis in preformed, presumably fully paired cores which have now been shifted to single ones (see $28^1/_2$ hours heat, % single).

3. This "immediate" heat effect seems progressive. See the two colums under "$52^1/_2$ hours heat" and compare them with the $28^1/_2$ hours column.

4. The asynaptic effect is carried through several generations after the mice have been returned to normal temperatures. A spermatogonial cell treated with heat conveys the effect, expressed as asynapsis, to its progeny.

II. Morphology and interpretation of cores

What are the cores or synaptinemal complexes? In the course of the study of heat-induced asynapsis a large number (over 200) of clearcut pictures of cores were obtained. From these cumulative observations a concept was formed pertaining to the rule and position of cores with reference to structure and function.

Kaufmann *et al.*, (1959) ably summarized various interpretations of the nature of cores. Under osmium fixation cores appear as axial threads within the cloud of fine-grained semifibrous electron-dense material interpreted to be chromosomal. While it was recently suggested by Nebel (1960) that the cores might represent leading longitudinal edges of chromosomes, the present observations do not increase the likelihood of such a scheme. Since osmium tetroxide and potassium dichromate are poor fixatives for DNA and nucleoprotein, final conclusions seem premature.

Our present position concerning the structure of chromosomes and the role of their cores in pairing is illustrated in Figs. 1—4. These three photographs and one drawing represent control material, but except for its influence on pairing, the heat treatment, as far as we can tell, did not affect the visible structure of the cores. Fig. 1 shows two synaptinemal complexes in a stage III pachytene spermatocyte. The chromosomes, sectioned longitudinally, show the accumulation of dense granular material surrounding the cores proper. The arrow points to a possible twist in the complex. Such discontinuities are common in thin sections. They must be critically scrutinized, especially since one is still searching for the possible physical equivalent of a locus of crossing over.

Fig. 2 (stage XII, zygotene spermatocyte) shows a fairly large number of synaptinemal complexes in cross section. The chromosomes are assumed still to be in bouquet arrangement and are cut at nearly right angles. Each lateral

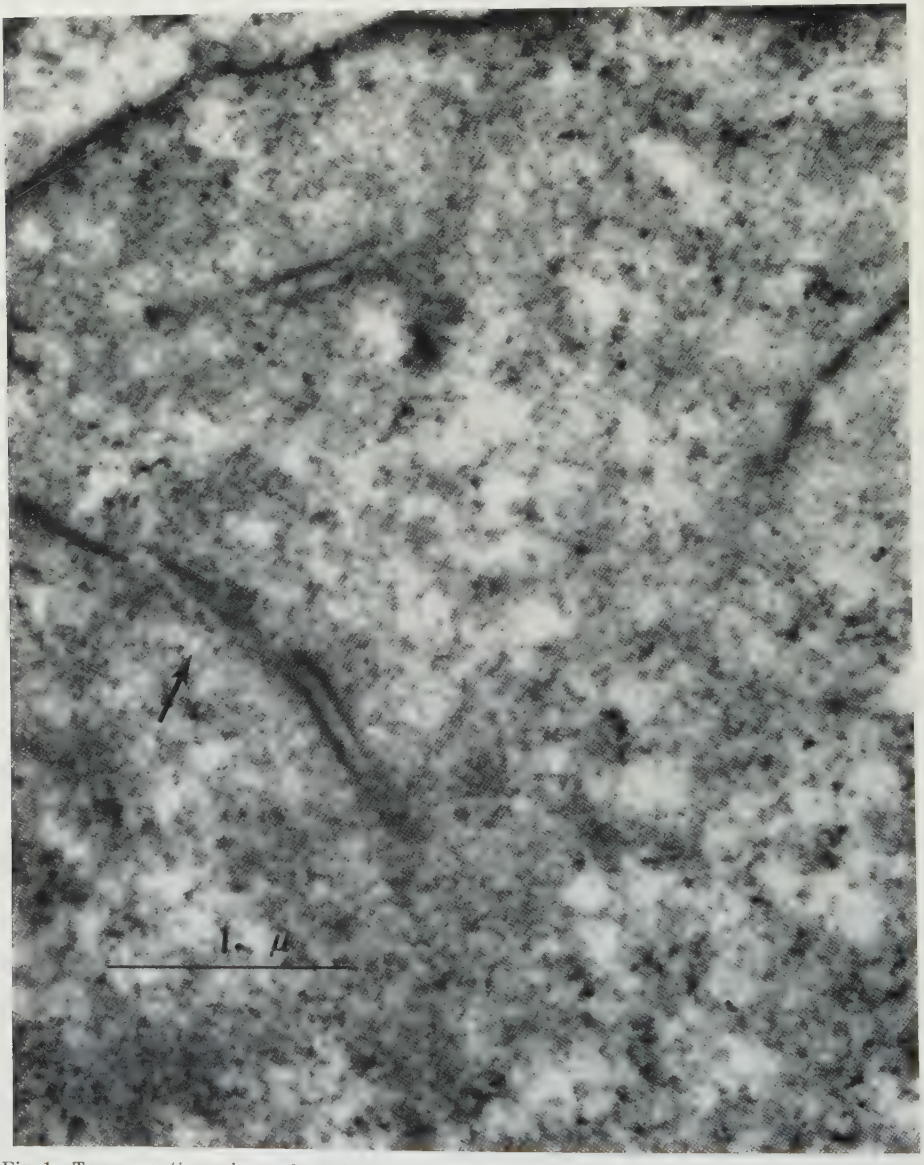


Fig. 1. Two synaptinemal complexes in a stage III (pachytene) spermatocyte in C57 B1 mouse. The arrow points to a possible twist in the complex. (35,000 ×)

component of a complex is represented by one dark spot, although occasionally it appears double. The arrow points to a complex in which this is especially clear. Dr. M. J. Moses has recently shown us photographs illustrating this point even more clearly using more favorable material (personal communication).

In Fig. 3 (pachytene spermatocyte) a high magnification of part of a core is photographed. This shows at the two arrows an apparent continuity of the upper

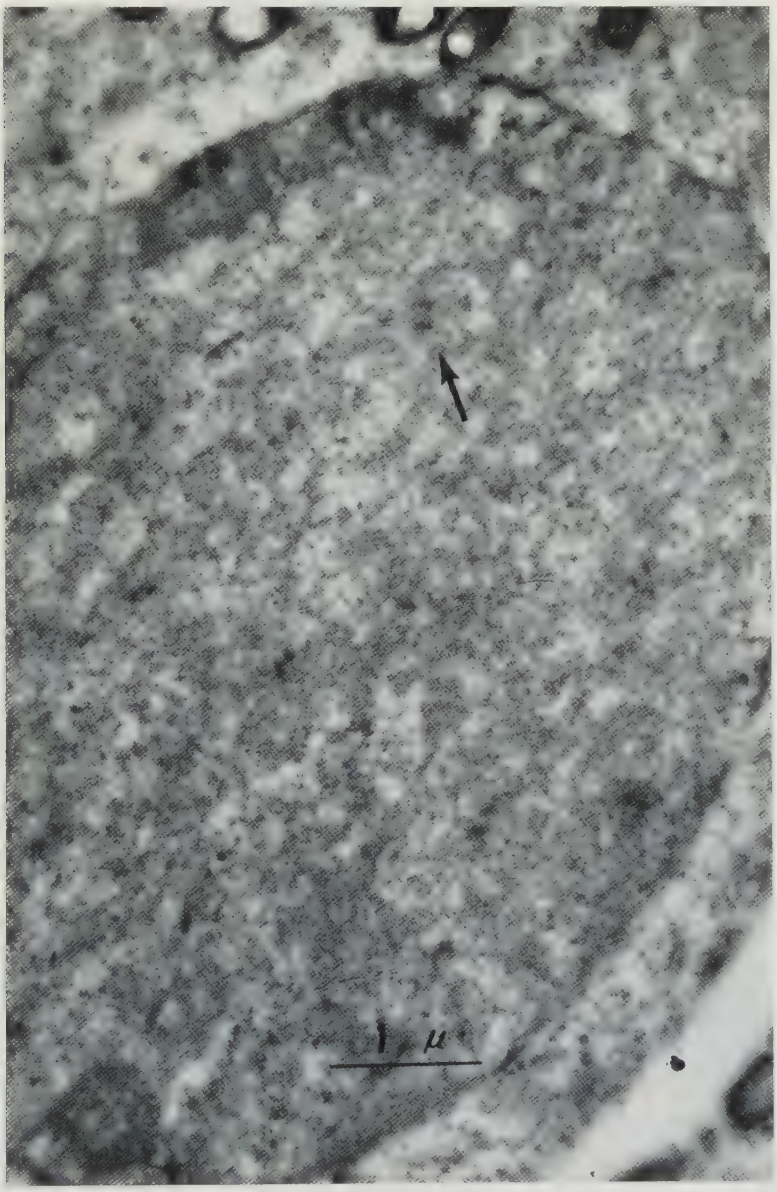


Fig. 2. Twelve or more synaptinemal complexes in cross sections from a stage XII (zygotene) spermatocyte in mouse. The chromosomes are in bouquet arrangement and cut at right angles. Each complex is represented by at least 2 dark spots. The arrow points to a complex suggesting one lateral component to be split. (20,000 ×)

lateral components with more loosely arranged microfibrillar bundles. If one follows the loosely arranged microfibrillar bundles from the top down, two of them-

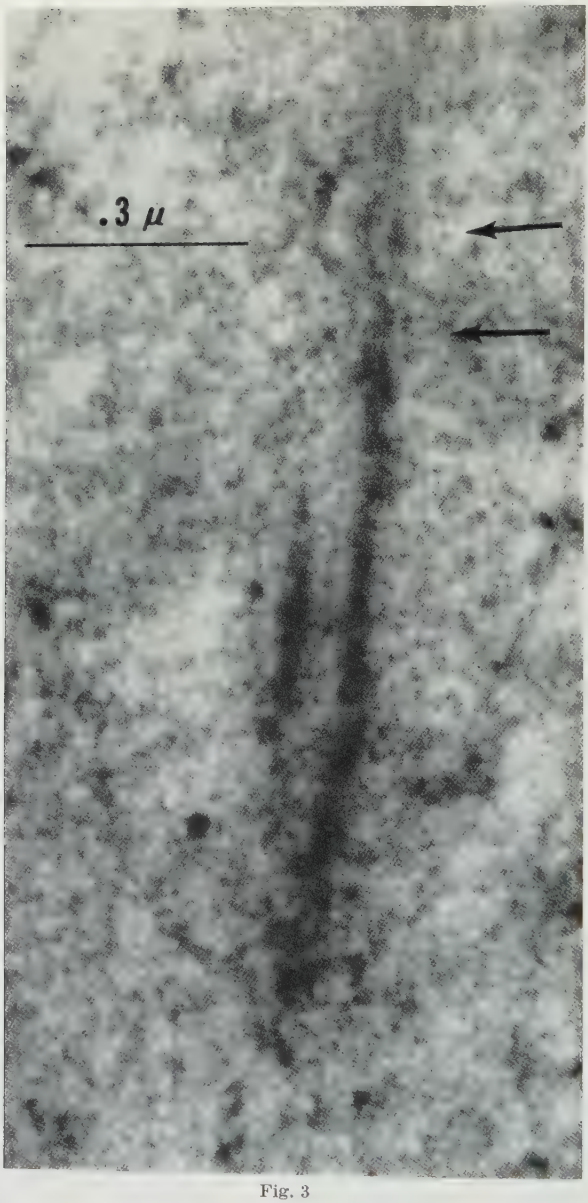


Fig. 3

Fig. 4

Fig. 3. High magnification of part of a synaptinemal complex showing an apparent continuity of one of the lateral components with more loosely arranged microfibrillar bundles (see the arrow to the upper right of center). The cell is a pachytene spermatocyte of a mouse. (100,000 ×)

Fig. 4. Ink tracing of photograph 3 drawn to emphasize the interpretation that the lateral components consist of closely compressed multiple bundles of parallel microfibrillae which toward the top appear to be loosened into less tightly coordinated strands. The cross hatched areas represent the lateral components of the synaptinemal (bivalent) complex and the stippled area illustrates the more loosely arranged microfibrillar bundles. Since the section is cut obliquely to the long axis of the synaptinemal complex it would be premature to interpret the two parallel strands in the stippled area as chromatids, although this possibility is not excluded

appear to lead into the right lateral complex. Fig. 4 is an ink tracing of photograph 3 drawn to emphasize the interpretation that the lateral components consist of closely compressed multiple bundles of parallel microfibrillae which toward the top appear to be loosened into less tightly coordinated strands. The smallest unit strand shown in the present photographs measures about 100 Å. As was pointed out in earlier studies, this type of strand is not the ultimate molecular unit (NEBEL 1959a).

C. Discussion

The results of the present work support the concept that the synaptinemal complexes are the pairing organelles of chromosomes in synapsis. Our observations suggest to us that the lateral components of the synaptinemal complexes consist of tightly packed microfibrillar elements representing the genetically most important part of the chromosome. Since synapsis serves the purpose of allowing crossing over between genetically homologous chromosomes one is tempted to believe that future studies will reveal the mechanism of crossing over within synaptinemal complexes. These complexes are looked upon as functionally simple chromosomal elements answering the requirements of the classical image of synapsis and crossing over.

This concept does not explain the functional identity or arrangement of the cloudy substance surrounding the cores. Comparative studies with the light microscope (MOSES 1956) have shown the surrounding material to be Feulgen-positive. The electron microscope has so far not allowed us to describe the fine structure of this substance. There appear to be the following possibilities: The material surrounding the cores may consist of irregular loops corresponding to the structures familiar from amphibian lampbrush oocytes. (NEBEL und HACKET 1961). It may correspond to the trophochromatin of classical cytology (WASSERMANN 1929). It thus may be of immediate genetic importance or have the characteristics of reserve material.

Our data show that the effect of elevated temperature is still present and expressed as partial asynapsis in the cores of mouse spermatocytes after 19 days. A nineteen-day interval in the lives of these cells implies that the heat effect was preserved through at least several cell generations.

The observations on asynapsis following heat treatment point up a very serious deficiency in present methods of fixing meiotic prophase stages (and somatic interphases) with such fixatives as the PALADE and the DALTON-ALTMANN. The presence of synaptinemal complexes in meiotic prophase of the mouse is actually almost the only concrete evidence for the whereabouts of the chromosomes during meiotic prophase. Thus more specific chromatin fixation is badly needed. Meanwhile our present conclusion that heat interferes with the presence and function of the synaptinemal complexes and leads to asynapsis rests on several inferences. We know from the light microscope that heat causes asynapsis, so when in the electron microscope we see few synaptinemal complexes after heat treatment, we conclude that asynapsis prevails. The alternate conclusion that pairing is unaffected but takes place "invisibly" is dismissed as quite unlikely. We must, however, try to show in the electron microscope first, the presence of discrete chromosomes at all stages of the meiotic and mitotic

cycle; and second, meiotic chromosomes in prophase with synaptinemal complexes, and, in case of heat treatment, without them, the former in the act of pairing, the latter not.

What kind of biophysical and biochemical events may one think of as being responsible for asynapsis? Ross (1960) has recently discussed synapsis as related to reduplication. While Ross outlines pathways for future research on synapsis, he does not deal with experimental asynapsis.

Dr. N. A. Frigerio has verbally pointed out to us that a primary event underlying asynapsis may be a very slowly reversible change in the hydrogen bonding of the "outer layers" of the gene strings. Assuming that this kind of change can be transmitted through successive cell generations, one is dealing with a near permanent change which is not a gene mutation but a gene modifier. Genetically this type of phenomenon deviates from classical definition but may be related to some more modern concepts such as unstable gene modifiers. Dr. Frigerio writes us in a personal communication:

"Q_{10} values for thermal protein denaturation are characteristically of the order of 100 to 600. Associated entropy changes have been observed, generally, in the range of 80 to 300 cal/deg/mol. These values are so much greater than those observed in ordinary chemical reactions that the "uncoiling" of the molecule occasioned by the breaking of hydrogen bonds has been invoked as an explanation; ... in highly ordered protein and nucleoprotein molecules the breaking of a large number of essential hydrogen bonds will occur over a very small temperature range. This will be accompanied by a large increase in entropy, (i.e., disorder of the molecular structure) and a resultant effective irreversibility."

Thus the asynapsis of chromosomes observed is explicable in terms of collapse of the weak bonds, probably hydrogen bonds, which ordinarily serve to 'zip' the two segments together.

D. Outlook

We need to know more about the biochemistry of cores and their immediate environment. Why can we not see chiasmata or loci of crossing over? Does the absence of visible equivalents of crossing over mean that the cores are not or do not contain the gene strings proper? Will trisomic or triploid forms show configurations of cores, corresponding to classical knowledge of trisomic and triploid pairing from the light microscope? What is the meaning of the persistence of cores to the spermatid stage in certain insects? As a first approach we are planning an autoradiographic study of the problem of cores at the level of the electron microscope.

Summary

In the present study the "life cycle" of synaptinemal complexes has been ascertained for C57 B1 male mice. These complexes appear in stage VIII and disappear in stage IX of the subsequent cycle. In the mouse, pairing of single cores is prompt; after stage X single cores are very rare. The appearance of cores in leptotene in the normal mouse is almost synonymous with pairing. No prolonged or clearly defined stage has been seen in which all the cores are single. Likewise the disappearance of cores with pachytene of stage X is abrupt. It was observed that in heat-treated material the occurrence of cores is depressed. This is true (1) in cores that must have been preformed before the treatment was

started — suggesting destruction of cores, (2) in cores formed during the progress of the experiment, and (3) in spermatocytes originating from cells that must have been subjected to heat several cell generations before they were observed. In all cases "asynapsis" is expressed as a depression of the total core number as well as a percent increase in the unpaired cores. The phenomenon of induced asynapsis is suggested to reflect a change in outer hydrogen bonds of the respective chromosomes.

References

Charard, R.: D'ultrastructure des chromosomes prophasiques méiotiques de quelque Orchidées. C. R. Acad. Sci. **249**, 1386—1388 (1959).

Fawcett, D. W.: The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, 403—406 (1956).

Kaufmann, B. P., H. Gay and M. R. McDonald: Organisational patterns within chromosomes. Int. Rev. Cytol. **9**, 77—128 (1960).

Moses, M. J.: Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, 215—218 (1956).

— The relation between the axial complex of meiotic prophase chromosomes and chromosome pairing in a salamander *(Plethoden cinereus)*. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 633—638 (1958).

Nebel, B. R.: Fine structure of chromosomes in man and other metazoa and testicular recovery from X-rays in mammals. Progr. Nuclear Energy, Ser. VI **2**, 404—410 (1959a).

— Observations on mammalian chromosome fine structure and replication with special reference to mouse testis after ionizing radiation. Radiat. Res. **1** Suppl., 431—452 (1959b).

— On the structure of mammalian chromosomes during spermatogenesis and after radiation with special reference to cores, 4th Internat. Conf. on Electron Microscopy **2**, 227—230. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.

—, and E. M. Hackett: Lampbrush fine structure of vertebrate male pachytene chromosomes. Naturwissenschaften 1961 (in press).

Oakberg, E. F.: A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. Amer. J. Anat. **99**, 391—413 (1956).

Ross, J. G.: A working hypothesis concerning synapsis. Proc. S.-Dakota Acad. Sci. **39**, 98—101 (1960).

Sotelo, J. R., and O. Trujillo-Cenóz: Electron microscope study on spermatogenesis, chromosome morphogenesis at the onset of meiosis (cyte I) and nuclear structure of early and late spermatids. Z. Zellforsch. **51**, 243—277 (1960).

Wassermann, F.: Die lebendige Masse. In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, S. 1—807, herausgeg. von W. v. Möllendorff. Berlin: Springer 1929.

Wilson, J. Y.: Chiasma frequency in relation to temperature. Genetica **29**, 290—303 (1959).

Dr. B. R. Nebel,
Division of Biological and Medical Research, Argonne National Laboratory,
9700 South Cass Avenue, Argonne, Illinois

Zeitschrift für Zellforschung 55, 566—576 (1961)

Institut d'Histologie de l'Université de Genève (Directeur: Professeur Ch. Rouiller)

NOTES CYTOLOGIQUES SUR LA GLANDE SUS-PAROTIDIENNE DU RAT ALBINOS

DIMORPHISME SEXUEL, VACUOLES CYTOPLASMIQUES ET VÉSICULES INTRANUCLÉAIRES

Par

T. D. Venkovski*

Avec 5 Figures dans le Texte

(Manuscrit reçu le 3 Juillett 1961)

La glande sus-parotidienne du rat albinos, ou glande de Loewenthal, est, en fait, une glande orbitaire externe; son long canal pénètre dans l'orbite où il conflue avec celui de la glande sous-orbitaire. Les deux glandes ont pratiquement la même structure. Découverte en 1899 par N. Loewenthal, la glande sus-parotidienne a fait l'objet d'un certain nombre de travaux récents. M. Baquiche (1958) lui a consacré une monographie, complétée par l'analyse d'une riche littérature; nous renvoyons à cette étude pour la description détaillée de cette glande et pour la bibliographie qui la concerne jusqu'à cette date.

Matériel et technique

Nous avons utilisé, pour cette recherche, 37 rats albinos adultes, soit 19 mâles pesant de 210 à 355 gr, 18 femelles pesant de 180 à 340 gr.

En nous référant aux tables de H. Donaldson (1924) ces poids correspondraient à des rats âgés de 4—12 mois. C'est dans ces limites d'âge que le dimorphisme sexuel de la glande de Loewenthal a été précédemment signalé par divers auteurs.

Les pièces, prélevées immédiatement sur les rats endormis à l'éther, ont été fixées dans les liquides de Bouin, de Dubosq-Brazil, de Zenker, de Helly, de Carnoy, de Susa ou dans le sublimé-formol acétique de Romeis.

Après inclusion à la paraffine, les coupes de 7 μ ont été colorées par l'hématoxyline-éosine, le van Gieson, le Mallory, l'Azan, le Kresazan selon Romeis et l'hématoxyline chromique de Gomori.

La détection des muco-polysaccharides a été faite par la méthode de MacManus (PAS) et les résultats obtenus comparés à ceux de la coloration au mucicarmin; la technique de Bauer nous a servi à contrôler l'absence de glycogène.

Pour l'analyse des acides nucléiques nous avons utilisé la réaction de Feulgen et la technique de Brachet au vert de méthyle-pyronine, avec contrôle à la ribonucléase, ainsi que la coloration métachromatique au bleu de toluidine.

Nous avons recherché l'activité phosphatasique alcaline par la méthode de Gomori, après fixation à l'alcool absolu froid, en employant comme substrat le glycérophosphate β de Na.

Enfin les graisses ont été mises en évidence sur coupes à la congélation, après fixation au formol et inclusion à la gélatine, par le Bleu de BZL (Ciba) et le Soudan III en solution sulfosalicylique, selon le procédé d'Hadjioloff.

* Nous adressons nos remerciements à Monsieur E. Bujard, Professeur honoraire, pour les précieux conseils qu'il nous a prodigués au cours de ce travail.

Observations personnelles

1. Acini

Chez les rats albinos âgés, les acini présentent un dimorphisme sexuel très évident, décrit récemment par M. Baquiche (1958, 1959).

Chez le *rat albinos mâle adulte*, les acini sont volumineux; leurs cellules sont caractérisées par l'aspect uniforme de leur cytoplasme et un polymorphisme nucléaire très marqué, quant à la taille et à la forme des noyaux; on remarque quelques très gros noyaux plus ou moins monstrueux et de nombreuses cellules, binucléées. Les limites cellulaires sont toujours peu visibles.

Chez le *rat albinos femelle adulte*, les acini sont un peu plus petits; les cellules, clairement délimitées, présentent un cytoplasme nettement différencié en une zone basale sombre et une région apicale claire. Le dimorphisme nucléaire est peu accentué; il n'y a pas de gros noyaux monstrueux; les cellules binucléées sont moins nombreuses que chez le mâle.

Dans nos préparations nous avons retrouvé ce dimorphisme sexuel et nous pouvons confirmer les descriptions antérieures en les complétant. Ainsi avec la coloration de Mallory ou celle à l'Azan, la cellule acineuse est uniformément teintée de rouge chez le mâle, tandis que chez la femelle la zone basale est rouge et le pôle apical parfois bleu pâle, parfois même d'un bleu assez vif, si l'on modifie la formule de l'Azan, en réduisant de moitié la proportion d'azocarmin.

La coloration au vert de méthyle-pyronine, pour déceler le RNA, accentue l'image du dimorphisme (Fig. 1 a et b). Chez le mâle, les cellules acineuses sont colorées en rouge sur toute leur étendue, avec cette remarque toutefois que la coloration, très intense dans la zone basale, présente une teinte plus ou moins décroissante en allant vers le pôle apical; la concentration du RNA serait donc plus grande à la base que dans le reste de la cellule. Chez la femelle, la réaction du RNA est localisée exclusivement sur la partie basale de la cellule, qui contient le noyau; la partie apicale reste incolore.

La réaction de MacManus (PAS) est très faible dans les deux sexes; la cellule acineuse, chez le mâle comme chez la femelle, ne contiendrait donc qu'une très petite quantité de polysaccharides décelables par cette méthode. Il faut toutefois noter la présence dans certains acini d'une mince bordure colorée, délimitant l'étroite lumière creusée au centre de l'acinus.

Dans le même groupe de réactions, la coloration avec le mucicarmin est négative et la réaction de Bauer pour la détection du glycogène est aussi négative.

Aucune activité phosphatasique alcaline n'est décelable par la méthode de Gomori dans les cellules acineuses des deux sexes, après une incubation de courte durée ($^1/_2$ à $2^1/_2$ h.); mais, si l'incubation est plus longue (5 à 6 h.), la réaction devient faiblement positive sur les cellules acineuses. De plus, on peut observer, parfois, un noircissement plus ou moins marqué à la périphérie des acini, comme E. Schmidt (1959) l'a aussi signalé. Il s'agit, semble-t-il, d'une diffusion de la phosphatase alcaline à partir des cellules myoépithéliales. En effet, ces dernières présentent une activité phosphatasique alcaline très intense et nous avons retrouvé toutes les images données par R. Lesson (1960a). Dans une seconde note, R. Lesson (1060b) décrit, en microscopie électronique, les espaces intercellulaires

séparant les cellules myoépithéliales du pied des cellules acineuses et les cellules acineuses entre elles; ces espaces renferment de minuscules expensions cytoplasmiques émanant des cellules acineuses.

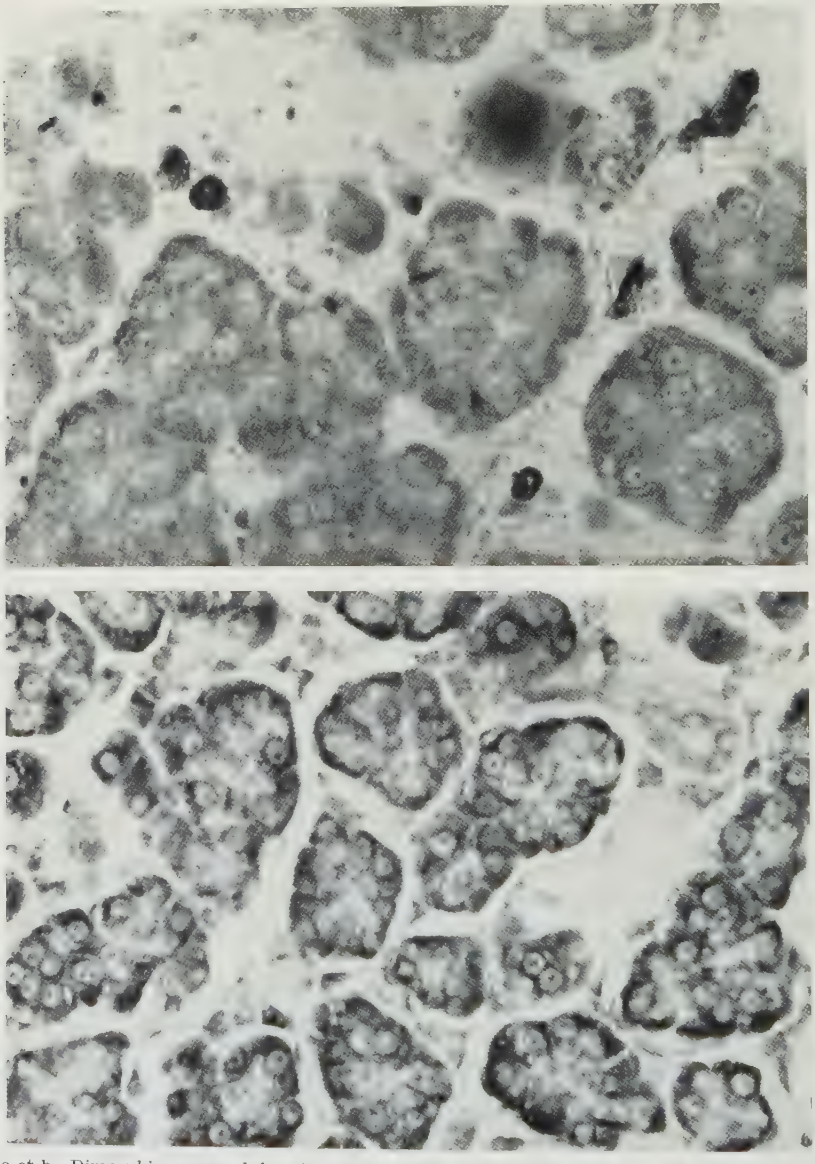


Fig. 1a et b. Dimorphisme sexuel dans la répartition du RNA. Coloration: vert de méthyle-pyronine. a) Rat ♂, 440 g. Répartition uniforme du RNA dans les cellules acineuses; les 5 cellules foncées sont des mastocytes, RNA + (Gross. × 530). b) Rat ♀, 240 g. Le RNA est concentré dans la partie basale des cellules acineuses. (Gross. × 530)

2. *Vacuoles cytoplasmiques*

N. Loewenthal (1908) a déjà signalé l'existence de vacuoles dans le cytoplasme des cellules acineuses; elles ont été retrouvées par A. Guieysse-Pellis-

SIER (1923), par O. JÄRVI (1938) et par E. SCHMIDT (1959). M. BAQUICHE (1958) a établi la distinction entre les microvésicules basales et les macrovésicules apicales; ces dernières peuvent déformer la cellule au point de lui conférer l'aspect «en bague» déjà observé par N. LOEWENTHAL. Le nombre et les dimensions des vésicules sont en relation avec l'âge et le sexe de l'animal. Quant à leur contenu, il n'a pas encore fait l'objet d'une étude systématique; E. SCHMIDT (1959) signale simplement l'existence de grandes vacuoles parfois incolores, parfois colorées en rose par l'éosine, en gris par l'hématoxyline ferrique, et pouvant donner une réaction de Millon positive.

a) Vacuoles basales. Ces vacuoles, localisées à la base de la cellule au voisinage du noyau, existent dans les deux sexes. Elles sont toujours petites, de dimensions très variables, leur diamètre oscillant entre 2 et 12 μ. Les plus petites d'entre elles sont plus ou moins visibles suivant le fixateur employé; c'est avec les fixateurs chromiques qu'elles sont le plus facile à observer.

Chez la femelle, quel que soit le volume de ces vacuoles, leur contenu ne se colore pas avec les différentes techniques utilisées.

Chez le mâle, elles sont parfois teintées en jaune, par le jaune de métanil dans la technique au mucicarmin, ou par l'acide picrique dans la méthode de van Gieson. Exceptionnellement, elles prennent une teinte violacée ou bleue avec l'azan. Elles sont, le plus souvent, PAS négatives; toutefois certaines sont positives, leur coloration rouge indique la présence d'un peu de muco-polysaccharides. La réaction du RNA par la méthode de Brachet, celle du DNA par la réaction de Feulgen et celle de la phosphatase alcaline de Gomori sont toujours négatives.

Dans cette même région basale, la détection des graisses met en évidence, dans les deux sexes, des gouttelettes soudanophiles, colorables aussi par le bleu de BZL. On peut se demander si ces gouttelettes lipidiques correspondent à une partie des vacuoles signalées plus haut ou s'il s'agit d'une autre sorte de vacuoles mélangées aux premières. La question reste ouverte, mais il est certain que, d'une part, le nombre des gouttelettes lipidiques est moins grand que celui des vacuoles basales et, d'autre part, que leur répartition dans le lobule, est différente. Les vacuoles à contenu lipidique s'observent surtout dans les acini situés en bordure du lobule, tandis que les vésicules non lipidiques existent dans tous les acini.

La présence d'inclusions lipidiques osmiophiles a déjà été mentionnée par N. LOEWENTHAL (1900); M. GRUJIC (1951) a observé que ces granulations osmiophiles sont inégalement réparties dans la glande, certains lobules en contiennent beaucoup, tandis que d'autres en sont totalement dépourvus.

b) Vacuoles apicales. A l'inverse des précédentes, ces vacuoles n'existent que chez le mâle relativement âgé. Les cellules présentant ce type de vacuoles sont rares; on n'en trouve guère qu' une ou deux par lobule et certains en sont complètement dépourvus. La dimension de ces vacuoles est très variable; les plus petites ont à peine 7 μ de diamètre, les plus volumineuses creusent tout le pôle apical en refoulant le noyau à la périphérie de la cellule, donnant naissance à l'image dite «en bague» décrite par N. LOEWENTHAL (1909, 1926) et M. BAQUICHE (1958) ou en forme de croissant, selon E. SCHMIDT (1958).

Leur forme et leur contenu sont variables. Elles sont, le plus souvent, régulièrement arrondies, exceptionnellement muriformes, comme si elles résultaient

de la confluence de vacuoles plus petites. Leur contenu ne se colore généralement pas, quelle que soit la technique employée et les vacuoles paraissent vides. Cependant quelques-unes contiennent parfois un précipité finement granuleux; dans d'autres cas, ce contenu est colorable par l'une ou l'autre des méthodes. Il se présente alors, soit comme un bloc homogène remplissant presque complètement la vacuole (Fig. 3), soit comme un amas de globules (Fig. 2). Lorsque le contenu de la vacuole forme un bloc homogène, il prend une teinte jaune par le van Gieson: il est coloré en rouge éclatant, en violet ou en bleu vif par le Mallory, l'azan et

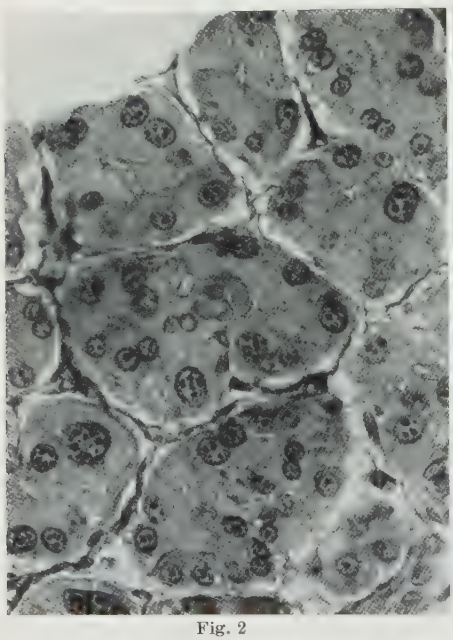


Fig. 2

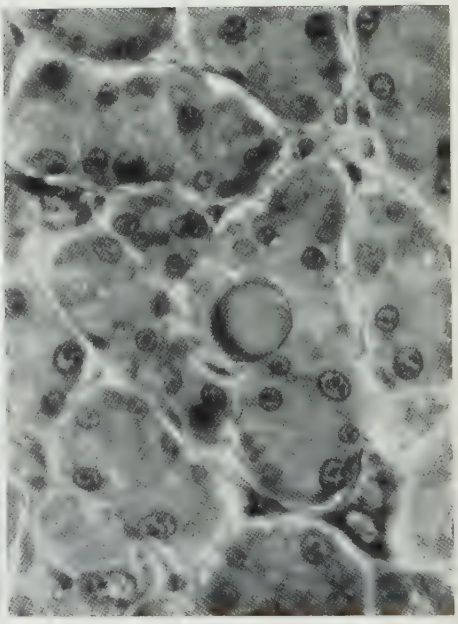


Fig. 3

Fig. 2. Rat ♂, 325 g. Vacuole apicale à contenu divisé en globules. (Azan modifié; Gross. × 400)

Fig. 3. Rat ♂, 290 g. Grosse vacuole apicale déformant le noyau; image dite «en bague». (Azan; Gross. × 400)

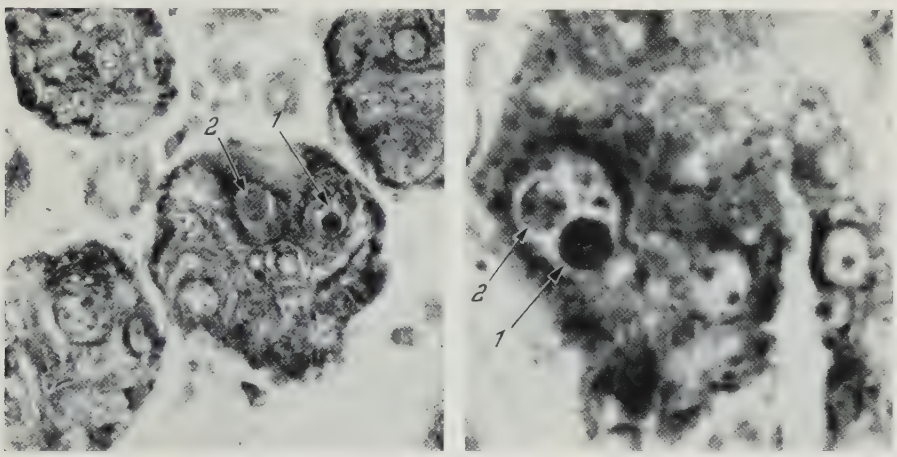
le créazan; parfois même, la partie centrale est rouge, bordée d'une auréole plus ou moins violacée. Lorsque le contenu est formé de globules, ceux-ci sont généralement colorés en gris bleu par ces dernières techniques, plus exceptionellement en rouge sale; parfois, une même vacuole contient côte à côte des globules colorés en rouge, en violet et en gris bleu. Ces variations d'aspect et de colorabilité semblent indiquer une évolution dans la constitution chimique du contenu de ces grandes vacuoles.

Le contenu homogène de certaines de ces vacuoles donne une réaction PAS positive, qui indique la présence de muco-polysaccharides; toutefois la coloration au mucicarmin reste négative, de même que celle du glycogène par la méthode de Bauer.

Enfin, le contenu des vacuoles ne renferme pas d'acides nucléiques, les réactions de Feulgen et de Brachet étant négatives. La méthode de Gomori donne également des résultats négatifs, ce qui exclut toute activité phosphatasique alcaline.

3. Noyaux

Les cellules acineuses présentent un polymorphisme nucléaire très marqué: d'une part, les noyaux ont des volumes différents, comme l'ont montré les études caryométriques de R. Collin et P. Florentin (1930) et, d'autre part, leur chromaticité varie également selon que leur structure est plus ou moins condensée. Toutefois, nous n'avons pas reconnu les deux catégories de noyaux décrites par E. Schmidt (1959) sous les termes de basophiles et d'acidophiles. A côté des cellules mononucléées, qui sont en majorité, il existe une proportion importante de cellules binucléées. Nous avons observé quelques mitoses, en général normales, parfois atypiques avec une répartition inégale de la masse chromatique pendant l'anaphase.



a b

Fig. 4 a et b. Nucléoles normaux et hypertrophiés. a) Rat ♂, 440 g. Acinus central: un gros nucléole dense *1* et un nucléole plus hypertrophié, *2* à RNA dilué. (Brachet; Gross. × 530). b) Rat ♂, 410 g. Dans le même noyau, deux gros nucléoles, de structure différente; *1* condensée, *2* à RNA dilué (Brachet; Gross. × 1000)

Chez la femelle, le polymorphisme nucléaire reste modéré; si les noyaux sont un peu différents de volumes et de chromaticité, ils sont toujours de forme arrondie et ils n'atteignent jamais un volume très important.

Chez le mâle, au contraire, ce polymorphisme est beaucoup accentué. Certaines cellules possèdent des noyaux ronds, très volumineux, véritables noyaux géants et parfois même d'énormes noyaux monstrueux, lobés de mille façons permettant de soupçonner des phénomènes d'amitose, qui seraient peut-être à l'origine de cellules multinucléées (M. Grujic 1930).

4. Nucléoles et vacuoles intranucléolaires

Les noyaux des cellules acineuses du mâle présentent des modifications du nucléole d'un caractère particulier; un certain nombre de gros noyaux réguliers renferment un gros nucléole (Fig. 4a), parfois deux (Fig. 4b), riches en RNA. Ces nucléoles, dits nucléoles plasmatiques par les auteurs qui les ont signalés (N. Loewenthal 1906, A. Guieysse-Pellissier 1923, M. Grujic 1931, M. Baquiche 1958), sont colorés en rouge par la pyronine dans la méthode de

Brachet: ils restent incolores par la technique de Feulgen, et quelquefois ils donnent une réaction PAS positive.

Ces nucléoles semblent être le siège d'une évolution spéciale; ils s'hypertrophient et prennent peu à peu l'aspect d'une *vésicule intranucléaire*, qui finit par remplir presque complètement le noyau, dont la chromatine est refoulée à la périphérie. Au fur et à mesure que cette vacuole grandit, sa colorabilité diminue, comme si le RNA était peu à peu dilué dans la vacuole.

Cette description confirme et complète celle des auteurs précédents qui parlent d'une hypertrophie du nucléole, interprétée par N. Loewenthal (1908) comme un processus dégénératif. M. Grujic (1931) ajoute qu'à des stades plus avancés, la paroi du noyau, considérablement distendue, peut céder; le contenu de la vacuole est ainsi déversé dans le cytoplasme; l'auteur n'a pu préciser la nature de ce qu'il considère comme une sécrétion nucléolaire.

Récemment, R. Cordier et E. de Harven (1960), utilisant le microscope électronique, ont donné une autre interprétation de ces inclusions intranucléaires. Ils en distinguent deux types: celles du type I, colorables en rouge par le vert de méthyle-pyronine de Unna et par la méthode de MacManus-Hotschkiss (PAS), correspondraient à des invaginations de matériel cytoplasmique dans le noyau; celles du type II, dont le contenu est grumeleux, sont PAS négatives et ne sont pas colorables par la technique de Unna. Les vacuoles des deux types sont Feulgen négatives.

Les images que nous avons observées, montrent tous les passages entre le nucléole compact (Fig. 4a et b) riche en RNA et la grande vésicule à RNA dilué (Fig. 4a et b), mais elles ne nous permettent pas de tirer des conclusions précises quant à la signification exacte de ces transformations nucléolaires.

Notons enfin, que les noyaux monstrueux plurilobés chez le mâle sont dépourvus de ces gros nucléoles, mais contiennent de petits nucléoles. Chez la femelle, les nucléoles sont toujours minuscules et, pour cette raison, paraissent manquer souvent.

5. Canaux excréteurs

a) Les canaux intercalaires sont des tubes assez étroits, tapissés d'un épithélium cubique, à petits noyaux ronds, peu chromatiques; nous n'avons jamais observé de cellules binucléées, ni de mitoses. Les cellues épithéliales sont généralement bordées par un plateau apical qui, dans quelques préparations, peut ressembler à une brosse apicale. Ce plateau est nettement PAS positif, comme la bordure apicale qui délimite la lumière de certains acini. Le mucicarmin colore aussi ce plateau, mais d'une manière moins précise et discontinue; les images sont moins nettes qu'avec le MacManus (PAS). Le contenu des canaux est aussi parfois légèrement positif avec le PAS, ce qui indique la présence d'un peu de mucopolysaccharides dans la sécrétion. Dans les conditions ordinaires, le cytoplasme des cellules épithéliales des canaux intercalaires ne renferme pas de RNA; la réaction de Brachet est négative.

Les canaux intercalaires possèdent, par contre, une grande activité phosphatasique alcaline, facile à mettre en évidence par la méthode de Gomori (Fig. 5).

b) Les canaux intralobulaires sont constitués par un épithélium un peu plus élevé, mais encore plus ou moins cubique. Les cellules ont les mêmes caractères que celles des canaux intercalaires (Fig. 5).

c) Les canaux interlobulaires ont un épithelium peu élevé, primatique, en général unistratifié; dans les plus grands d'entre eux, il devient bistratifié, avec une couche basale polyédrique. La réaction de MacManus est inégalement positive sur le plateau apical, qui paraît parfois comme discontinu. La réaction du RNA est par contre négative. L'activité phosphatasique alcaline est faible, presque nulle, mais on trouve encore quelques cellules nettement positives.

En résumé, ce qu'il y a de plus notable à retenir est la présence d'une activité phosphatasique alcaline dans l'épithélium des canaux; très positive au niveau des petits canaux intercalaires, elle décroît progressivement le long de l'arbre sécréteur

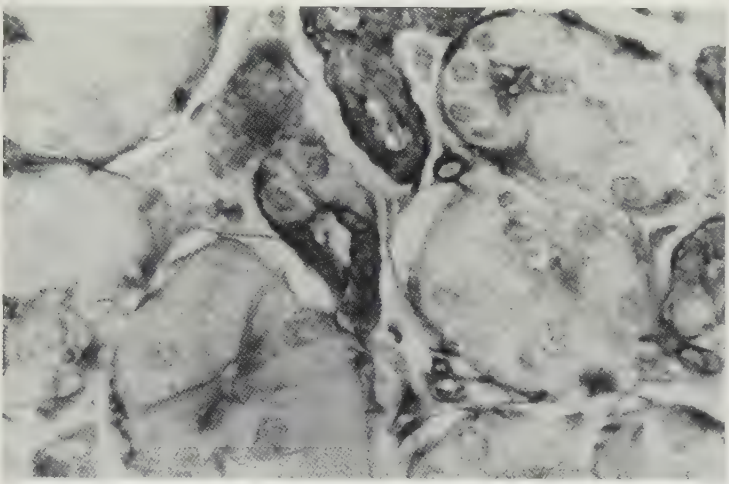


Fig. 5. Rat ♂, 225 g. Phosphatase alcaline. Les cellules myoépithéliales, les canaux intercellulaires (à g. en bas) et les canaux intralobulaires donnent une réaction + (Gomori; Gross. × 550)

et devient presque nulle au niveau des canaux collecteurs interlobulaires, à l'exception de quelques cellules dans lesquelles elle reste positive.

Le fait qu'E. Schmidt (1959) n'ait trouvé au niveau des canaux intercalaires qu'une activité phosphatasique alcaline légère, pourrait s'expliquer par un début de transformation dite «harderienne» comme nous l'avons décrite dans une note précédente (E. Bujard et T. Venkovski 1960).

6. Tissu conjonctif

La trame conjonctive de la glande juxtaparotidienne est plus développée que celle des glandes salivaires; elle est délicate dans les espaces interacineux et plus abondante entre les lobules, autour des canaux et des vaisseaux sanguins.

Elle présente une grande richesse cellulaire; elle contient passablement de lymphocytes, quelques plasmocytes et de nombreux mastocytes. Ceux-ci sont en général groupés autour des canaux, cependant quelques-uns sont aussi disséminés entre les acini. La glande de Loewenthal est donc un matériel favorable à l'étude des cellules conjonctives basophiles. Nous aurons l'occasion d'y revenir.

Les diverses colorations et réactions que nous avons employées n'ont rien révélé de particulier dans le tissu conjonctif. Nous avons cependant constaté la présence d'une activité phosphatasique alcaline dans les lymphocytes, dans les

mastocytes et dans endothélium des capillaires et des petits vaisseaux, comme cela a déjà été observé par divers auteurs.

Discussion

Le dimorphisme sexuel de la glande sus-parotidienne de Loewenthal, chez le rat albinos adulte, est très net à partir d'un certain âge; il porte à la fois sur le cytoplasme des cellules acineuses et sur leurs noyaux.

Les auteurs qui ont examiné cette glande se sont cantonné, le plus souvent, dans l'étude du polymorphisme nucléaire qui est très important chez le mâle et presque insignifiant chez la femelle. Nous rappellerons que le polymorphisme nucléaire a fait l'objet de précisions apportées par N. Loewenthal lui-même (1900), par A. Guieyesse-Pellissier (1923), par R. Collin et P. Florentin (1930), par M. Grujic (1931), par H. Teir (1949), par M. Baquiche (1958 et 1959).

Les descriptions du dimorphisme cytoplasmique sont, par contre, rares; à notre connaissance seuls, Parhon et ses collaborateurs (1955) et M. Baquiche (1958, 1959) ont signalé que, chez le mâle, le cytoplasme des cellules acineuses est dense, d'aspect presque uniforme, tandis que chez la femelle, il présente nettement une différenciation zonaire, la région apicale étant claire, la région basale, contenant le noyau, étant plus foncée.

Nos observations confirment et complètent cette description: la différence d'aspect des acini entre les deux sexes est déjà visible avec les techniques courantes (coloration à l'hématoxyline-éosine, van Gieson, Azan et méthodes parentes). Elle est encore plus marquée avec le vert de méthyle-pyronine, qui décèle la présence de RNA dans toute l'étendue du cytoplasme chez le mâle, tandis que cet acide est localisé dans la base de la cellule chez la femelle. Nous ne pouvons donc souscrire à l'opinion d'E. Schmidt (1959) qui écrit: „Ferner konnten wir an der Glandula orbitalis externa von ♂ und ♀ keine Unterschiede feststellen".

Une différenciation cytoplasmique bien marquée chez la femelle, un polymorphisme nucléaire très accentué chez le mâle, ne sont pas les seuls caractères du dimorphisme sexuel de la glande sus-parotidienne, chez les rats albinos âgés. Il faut y ajouter la présence, chez le mâle, de vacuoles cytoplasmiques, qui sont situées au pôle apical des cellules et qui peuvent avoir des dimensions considérables; la composition du contenu de ces vacuoles est difficile à préciser; mais il paraît formé à la fois de protides comme l'indique son éosinophilie et la réaction de Millon positive (E. Schmidt 1959) et de polysaccharides en quantité variable, détectés par la réaction de MacManus (PAS). Ce contenu semble subir une évolution, puisque l'on constate des variations de sa colorabilité et de son aspect; il est tantôt d'un seul bloc, tantôt morcelé en plusieurs globules. Il s'agit vraisemblablement d'un produit d'élaboration de la cellule qui signifie peut-être un processus dégénératif, puisque ces vacuoles ne s'observent que chez les mâles âgés et que leur nombre augmente avec l'âge.

Notons enfin, comme dernier caractère sexuel, les modifications nucléaires particulières au mâle; chez celui-ci, dans les noyaux acineux réguliers de grande taille, les nucléoles subissent une transformation vésiculaire, dont l'interprétation prête encore à discussion.

Résumé

Nous avons étudié la glande sus-parotidienne de Loewenthal ou glande lacrimale exorbitale à l'aide de différentes colorations histo-chimiques, qui nous ont permis de préciser les faits suivants:

1. Chez les rats albinos âgés, la distribution du RNA n'est pas la même dans les cellules acineuses des femelles et des mâles, ce qui confirme le dimorphisme sexuel du cytoplasme, à côté de la différence de degré du polymorphisme nucléaire déjà bien connu.

2. La cellule acineuse est creusée de trois sortes de vacuoles a) des vacuoles basales, en général petites et multiples, communes dans les deux sexes; b) des vacuoles ou gouttelettes lipidiques soudanophiles, communes dans les deux sexes; c) des vacuoles apicales de grandeur variable, particulières aux mâles âgés; le contenu de ces vacuoles est d'aspect et de colorabilité variables; il paraît formé parfois de protides (Millon +), parfois de polysaccharides (PAS +) ou de leur mélange.

3. Chez le mâle, les nucléoles, dans les gros noyaux réguliers, s'hypertrophient parfois et peuvent même se transformer en une vésicule volumineuse.

Bibliographie

Baquiche, M.: La glande orbitaire sus-parotidienne de Loewenthal chez le rat albinos, son dimorphisme sexuel. Thèse de biologie médicale, No 5, pp. 84. 1958, Fac. de Méd. Genève.

— Le dimorphisme sexuel de la glande de Loewenthal chez le rat albinos. Acta anat. (Basel) **36**, 247—280 (1959).

Bujard, E., et T. Venkovski: Quelques remarques histochimiques sur les transformations dites Harderiennes dans la glande de Loewenthal. Acta anat. (Basel) **41**, 339 (1960).

Collin, R., et P. Florentin: Recherches caryométriques sur la glande de Loewenthal et la croissance rythmique des noyaux. C. R. Ass. Anat. **25**, 93—103 (1930).

— — Nouvelles recherches caryométriques sur la glande de Loewenthal. C.R. Soc. Biol. (Paris) **104**, 1279—1281 (1930).

Cordier, R., et E. de Harven: Les inclusions intranucléaires dans la glande de Loewenthal du rat et leur aspect en microscopie électronique. C.R. Ass. Anat. **46**, 182—189 (1959).

— — Les inclusions nucléaires de la glande de Loewenthal du rat mâle en microscopie électronique. C.R. Acad. Sci. (Paris) **250**, 398—400 (1960).

Donaldson, H. H.: The rat: Data and references tables. Memoir No 6 of the Wistar Institute of Anatomy and Biology, 2nd ed. 1924.

Gabe, M.: Conditionnement hormonal de la morphologie des glandes sus-parotidiennes chez le rat albinos. C.R. Soc. Biol. (Paris) **149**, 223—224 (1955).

Grujic, M.: Contribution à l'histologie de la glande de Loewenthal. Thèse No 102, pp. 85, 1931, Nancy.

Guieyesse-Pellissier, A.: Etude des cellules de la glande sus-parotidienne du rat albinos. C.R. Ass. Anat. **18**, 243—252 (1923).

— Hypertrophies nucléaires: noyaux géants, noyaux informes, amas de noyaux. Arch. Anat. micr. **22**, 329—373 (1926).

Järvi, O.: Über die Einwirkung verschiedener Vitaminmangelzustände auf die Speicheldrüsen des Meerschweinchens und der Ratte und auf die Glandula orbitalis externa der Ratte sowie Beobachtungen über den normalen Bau dieser Drüsen. Ann. Acad. Sci. fenn. A. **49**, 1—83 (1938).

Lesson, R.: The histochemical identification of myoepithelium, with particular references to the Harderian and exorbital lacrimal glands. Acta anat. (Basel) **40**, 87—94 (1960).

— The electron microscopy of the myoepithelium on the rat exorbital gland. Anat. Rec. **137**, 45—56 (1960).

Lison, L.: Histochimie et cytochimie animales. 3e éd. Paris 1960.

Loewenthal, N.: A propos des glandes infra-orbitaires. J. Anat. (Paris) **35**, 130—132 (1899).
Drüsenstudien. II. Die Glandula infraorbitalis und eine besonders der Parotis anliegende Drüse bei der weißen Ratte. Arch. mikr. Anat. **56**, 535—552 (1900).
— Contribution à l'étude des granulations chromatiques ou nucléodïes. J. Anat. (Paris) **42**, 320—324 (1906).
— Des mitochondries de l'épithélium de la glande sus-parotidienne du rat blanc. Arch. Anat. (Strasbourg) **5**, 321—356 (1926/7).
Parhon, C. I., A. Babes, F. Petrea et E. Burgher: Structura si dimorfismul sexual al glandelor parotide la Sobolanul Alb. Bul. Sti. Sectia de Sti. med. **7**, Nr 3 (1955) (Université de Bucarest).
Pearse, A. G. E.: Histochemistry theoretical and applied, 2nd ed. London 1960.
Schmidt, E.: Funktionelle Histologie der Glandula orbitalis externa. Z. mikr.-anat. Forsch. **65**, 377—396 (1959).
Teir, H.: On the size of the nuclei in the glandula infraorbitalis of the white rat. Acta path. microbiol. scand. **26**, 620—635 (1949).
Walker, R.: Age changes in the rat's exorbital lacrimal gland. Anat. Rec. **132**, 49—69 (1958).

T. D. Venkovski, Institut d'Histologie et d'Embryologie,
Faculté de Médecine, Sofia, Bulgarie

Zeitschrift für Zellforschung 55, 577—596 (1961)

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Kiel
(Direktor: Prof. Dr. med. W. Bargmann)

WEITERE STUDIEN AM SACCUS VASCULOSUS DER FISCHE*

Von

W. Bargmann und A. Knoop

Mit 16 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. August 1961)

Seit der Mitteilung der lichtmikroskopischen Beobachtungen am Saccus vasculosus von Bargmann (1954) ist eine Reihe von Veröffentlichungen erschienen, die sich mit dem Feinbau dieses auffälligen Organs am Boden des Zwischenhirns der Fische beschäftigen. Die Autoren setzen sich insbesondere mit der Frage auseinander, ob die Krönchenzellen des Saccusepithels *sekretorisch tätige Elemente* sind, wie Bargmann meint, oder ob sie *rezeptorische Funktionen* ausüben (Lit. bei Dorn 1959), oder schließlich, ob sie sowohl die eine als auch die andere Aufgabe erfüllen.

Zugunsten der Sekretionstheorie sind folgende Feststellungen getroffen worden: van de Kamer, Boddingius und Boender (1960) fanden in den Krönchenzellen der Forelle ein schwach PAS- bzw. Aldehydfuchsin-positives Cytoplasma und in ihren Endknöpfchen ein stärker PAS-positives Material; sie stellten die Hypothese auf, die Zellen sonderten ein saures Mukopolysaccharid ab. Unter Pilocarpineinwirkung komme es in manchen Krönchenzellen zu einer Steigerung der Sekretion. Ferner stellten Jansen und van de Kamer (1961) in den Krönchenhaaren der Regenbogenforelle und in ihren Verdickungen, weiter im Saccuslumen saures Mukopolysaccharid fest. Diese Befunde erhoben bereits Stahl und Seite (1960) an Gehirnen anderer Teleostier; es handele sich nicht um Hyaluronsäure. Dorn (1954) und Katagishi (1961) bestätigen Bargmanns Angaben über das Vorkommen von Kolloid im Saccuslumen für Box boops bzw. Cyprinus carpio. Dieses Material gebe eine positive PAS-Reaktion, doch fand Katagishi in den Krönchenzellen selbst keine Substanz mit deutlicher Polysaccharidreaktion. Zwillenberg (1961) wies in Krönchenzellen der Forelle, in denen sich kein saures Mukopolysaccharid darstellen ließ, Cystin nach. Diese Verbindung dürfte nach seiner Auffassung als „precursor" zur Biosynthese von saurem Mukopolysaccharid dienen.

Setzt man die Ergebnisse der lichtmikroskopischen, insbesondere der histochemischen Beobachtungen an den spezifischen Saccuszellen zu den bisher *elektronenmikroskopisch* gewonnenen Befunden in Beziehung, so ergibt sich eine ebenso interessante wie zwiespältige Situation. Der Krönchensaum trägt nämlich nach den elektronenmikroskopischen Beobachtungen von Bargmann und Knoop (1955) einmal die morphologischen Merkmale von Cilien. Auf der anderen Seite zeichnet sich die Struktur der Endkölbchen dieser Cilien durch eine erstaunliche Variabilität aus. So z. B. läßt sich eine beträchtliche Aufblähung von Schläuchen innerhalb der Endknöpfe und deren Umgestaltung zu Ballons nachweisen, in

* Durchgeführt mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

denen eine flüssige oder halbflüssige Substanz zu vermuten ist. Bargmann und Knoop halten eine Stoffabgabe an den Liquor durch Platzen der Endknöpfe für möglich. Porter (1957) bestätigt die Beschreibung von Bargmann und Knoop im wesentlichen, schließt sich jedoch — trotz der oben erwähnten histochemischen Feststellungen — der Ansicht nicht an, die Krönchen stünden im Dienste einer Stoffabgabe. Fawcett (1961) zieht aus den elektronenmikroskopischen Schilderungen, d. h. ohne die mit anderen Methoden erhaltenen Ergebnisse zu berücksichtigen, folgendes Fazit: "The processes on the crown cells can only be cited as nonmotile modified cilia of unknown function". Man sollte jedoch nicht vergessen, daß Boeke (1902, Lebendbeobachtungen) zwar eine Flimmerbewegung der Krönchen vermißte, ein leichtes Zusammenziehen der Zellköpfchen jedoch beobachtet hat, und daß eine Reihe anderer Autoren über das Vorkommen von kolloidalem Sekret im Saccuslumen berichtet. Auch Kurotaki (1961) äußert auf Grund elektronenmikroskopischer Untersuchungen Zweifel an der Sekretionstheorie. Der Autor hebt die Ähnlichkeiten in der Organisation der Krönchenzellen und der Stäbchen- und Zapfenzellen in der Retina hervor. Zugleich betont Kurotaki das Vorhandensein von Vakuolen in den knopfartigen Anschwellungen der Krönchenhaare, die letzteren eine gewisse Ähnlichkeit mit den nicht voll entwickelten Außengliedern der Stäbchen verleihen soll. Weiter schreibt Kurotaki: "It was impossible to find any figures of collapsed or extremely expanded vacuoles in the upper swelling part as observed by Bargmann and Knoop (1955). It seems that these figures reported by them were artifacts produced by the early incomplete electron microscopical technique and due to the susceptibility of this upper swelling portion to the fixation fluid". Kurotaki neigt der Rezeptortheorie zu.

Die Äußerungen von Fawcett und Kurotaki regen zu einer erneuten licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchung des Epithels im Saccus vasculosus an, über die im folgenden berichtet wird. Zunächst bemühten wir uns, mit Hilfe des Elektronenmikroskopes festzustellen, ob die seinerzeit von uns beschriebene Variabilität in der Organisation der Endkölbchen der Krönchenhaare auch mit der inzwischen verbesserten Methodik nachgewiesen werden kann. Ferner versuchten wir, durch Beobachtung von frischem Saccusgewebe die Frage nach der Beweglichkeit der Krönchenhaare zu klären.

Material und Methodik

Der Saccus vasculosus folgender Fischarten wurde licht- und elektronenmikroskopisch untersucht: 1. *Scylliorhinus caniculus* (Mittelmeer), 2. *Raja spec.* (Mittelmeer), 3. *Anguilla vulgaris* (Ostsee), 4. *Cottus bubalis* (Ostsee).

a) Lichtmikroskopische Untersuchungen: Untersuchung von Schnittpräparaten. Fixation der Fischgehirne mit Formalin 9:1, Bouins Gemisch, Susa. Paraffinschnitte (8—10 μ Dicke). Färbungen mit Hämatoxylin-Eosin, Azan (M. Heidenhain), Chromalaunhämatoxylin-Phloxin nach Gomori.

Untersuchung des Saccus vasculosus, der von 8 Exemplaren von *Cottus bubalis* am lebensfrischen Objekt stumpf von der Gehirnbasis abpräpariert (binokulares Lupenmikroskop) und dann abgeschnitten wurde. Streifen der Saccuswand wurden sofort teils in Seewasser, teils in physiologischer Kochsalzlösung mit der Ölimmersion beobachtet.

b) Elektronenmikroskopische Untersuchungen: Lebensfrisch entnommene Organstückchen wurden 2 Std lang in Osmiumsäurelösung fixiert (1%, p_H 7,5; mit Michaelispuffer eingestellt). Im Hinblick auf die voneinander abweichenden Angaben in der Literatur verwen-

deten wir zur Fixation Lösungen mit verschiedener Gefrierpunktserniedrigung (*Cottus:* $\Delta i = -0{,}7$ und $-0{,}75$. *Anguilla:* $\Delta i = -0{,}62$ und $-0{,}64$. Einstellung mit NaCl).

Entwässerung in 70-, 90- und 100%igem Äthylalkohol. Einbettung in einem Gemisch aus Methacrylsäurebutylester und Methacrylsäuremethylester 9:1. Anfertigung der Schnitte

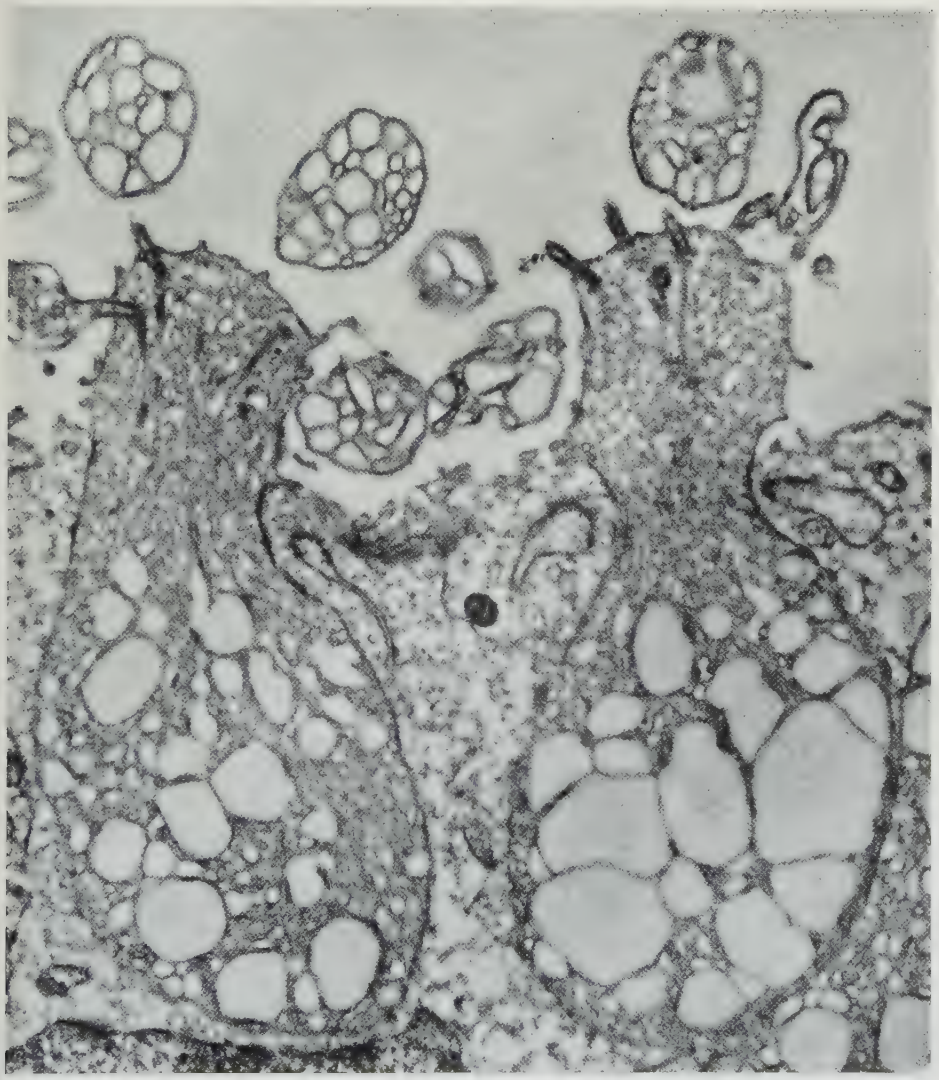


Abb. 1. Zwei Krönchenzellen von *Scylliorhinus caniculus* mit starker Vakuolisierung des Zelleibes. Beachte den verschiedenen Grad der Kammerung in den Endkölbchen. Vergr. 13800fach

mit einem Porter-Blum-Mikrotom. Aufnahmen: Siemens Elmiskop I (80 kV, Objektivapertur 50 μ).

Für die Überlassung in Osmiumsäure fixierten, eingebetteten Saccus-Materials von *Scylliorhinus* und *Raja* aus dem Golf von Neapel danken wir Herrn Prof. Horstmann, Hamburg.

Befunde

1. Scylliorhinus caniculus. Das Epithel des Saccus vasculosus dieses Tieres besteht aus *Krönchenzellen* und aus *Stützzellen*, die sich auffällig voneinander unterscheiden. Die

Krönchenzellen überragen das Niveau der Stützzellen mit einem Halsabschnitt, dessen halbkugeliges apikales Ende das Krönchen trägt. Im Hinblick auf frühere Veröffentlichungen wird von einer ins einzelne gehenden Schilderung der lichtmikroskopischen Befunde abgesehen.

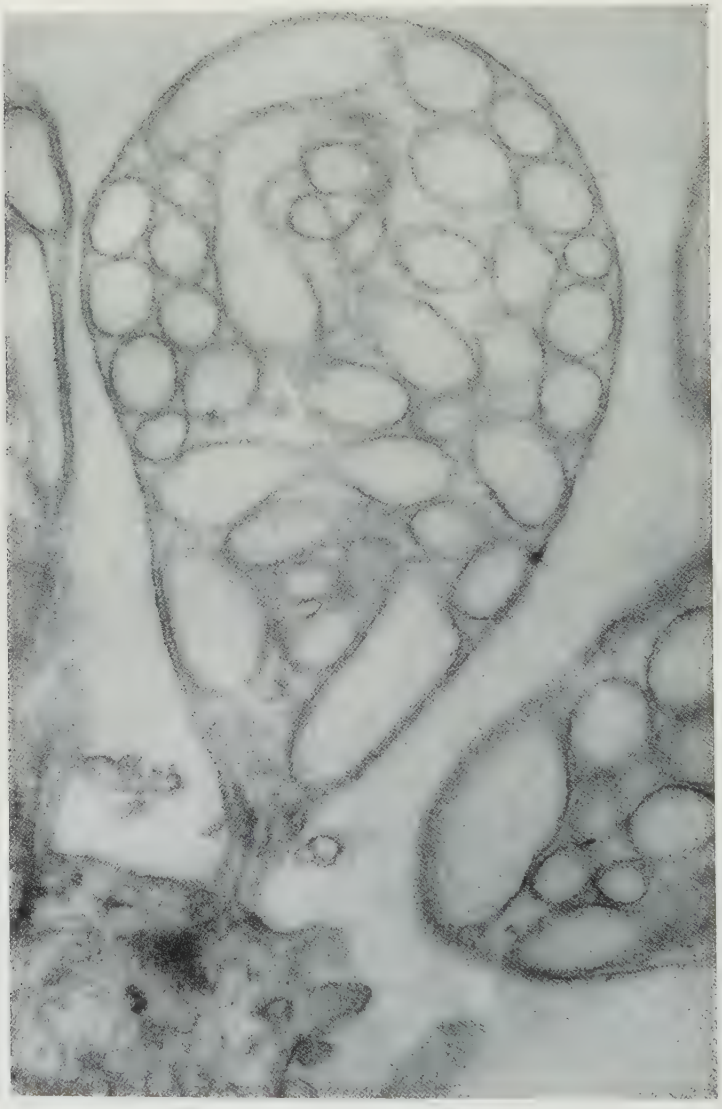


Abb. 2. Endkölbchen einer Krönchenzelle von *Scylliorhinus caniculus*. Vergr. 40300fach

Das Cytoplasma der *Krönchenzellen* zeichnet sich durch seine verhältnismäßig dichte Struktur und das Vorhandensein zahlreicher kleiner und großer Vakuolen aus, deren größte in den basalen Zellabschnitten — vor allem nahe dem Plasmalemm — liegen (Abb. 1). Auf der Photographie erscheinen die scharf konturierten Blasen optisch leer. Sie entsprechen zweifelsohne den von van de Kamer und Verhagen (1954) bei *Scylliorhinus* lichtmikroskopisch festgestellte Vakuolen,

doch ergaben sich keine Anhaltspunkte für ihre Entstehung im Zellkern, welche die Autoren annehmen. Ein Teil der kleinen Bläschenprofile dürfte Querschnitten

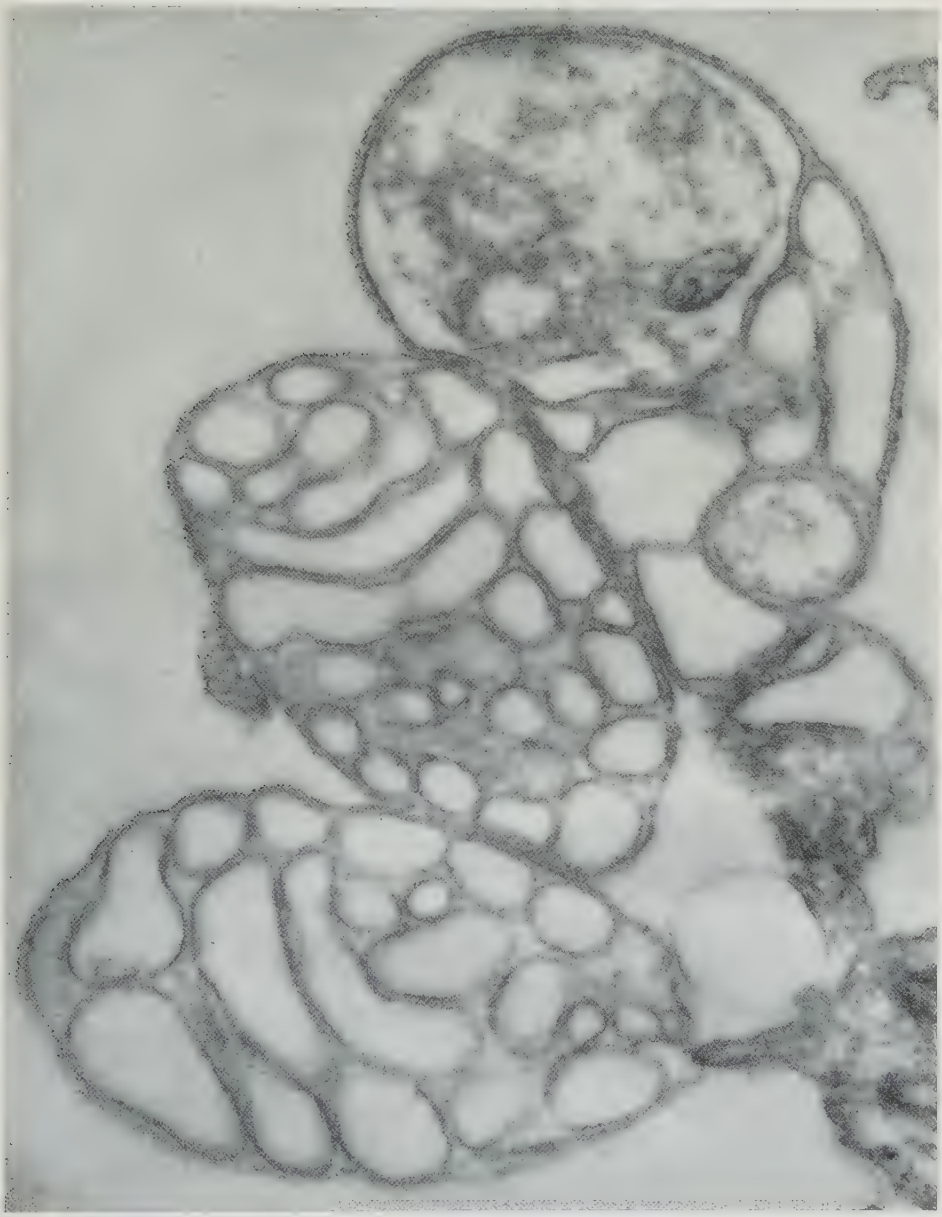


Abb. 3. Gekammerte Endkölbchen einer Krönchenzelle von *Scylliorhinus caniculus*. Oben Blase mit amorphem Inhalt. Vergr. 68000fach

von Schlauchformationen entsprechen. Kleine Mitochondrien vom Cristatypus sind unregelmäßig im Zelleib verteilt.

Die *Stützzellen* besitzen ein auffallend locker strukturiertes, d. h. hell erscheinendes Cytoplasma. Mitochondrien kommen auch in den lumennahen Partien

ihres Zelleibes vor. Im Halsbereich der Krönchenzellen bilden die Stützelemente eine Art von Kragen, mit dem sie sich dem apikalen Abschnitt der Krönchenzellen eng anschmiegen.

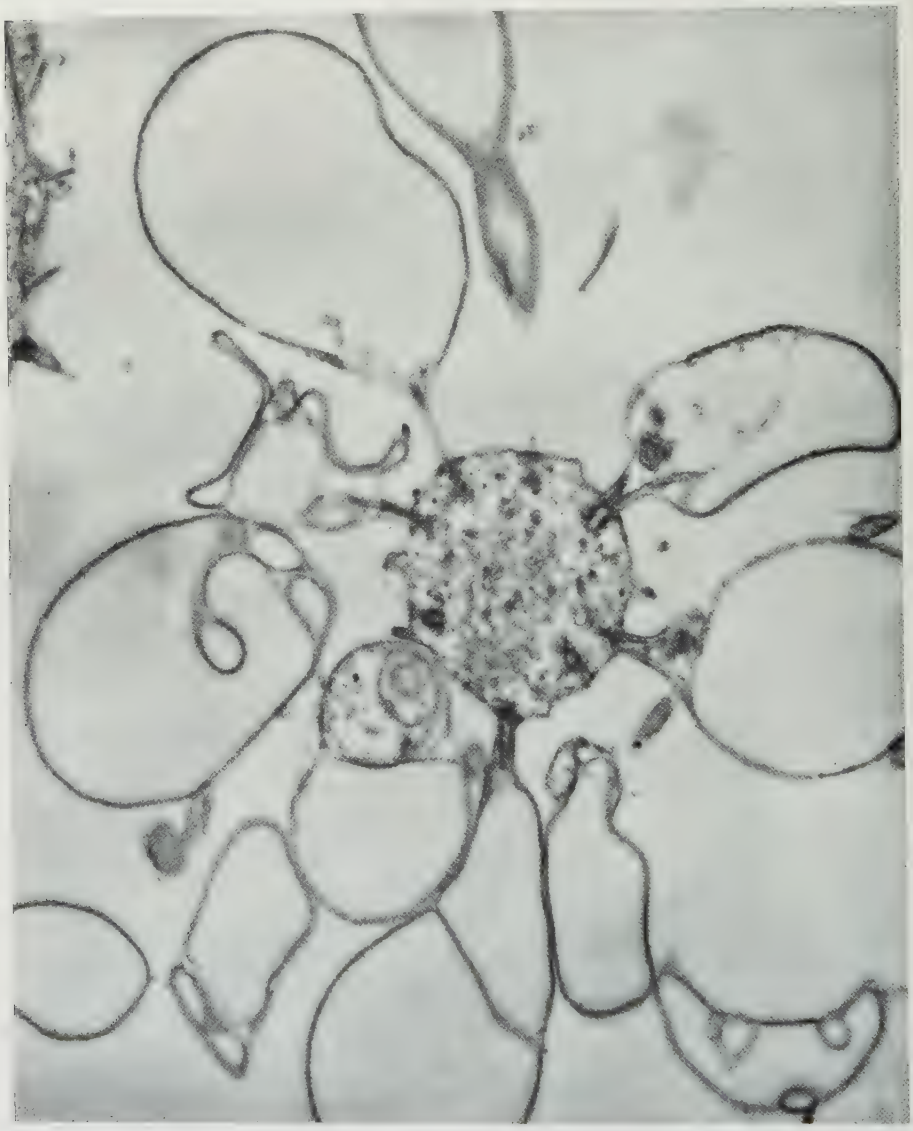


Abb. 4. Tangentialschnitt durch eine Zellgruppe mit Krönchenbesatz, *Scylliorhinus caniculus*. Beachte den Balloncharakter der Endkölbchen. Vergr. 17 000fach, zur Reproduktion verkleinert

Das Strukturbild der *Krönchen* ist erstaunlich mannigfaltig. Man beobachtet sowohl an den Endknöpfchen innerhalb eines einzigen Krönchens als auch an Krönchen eng benachbarter Zellen sehr verschiedenartige Bildungen. Vergleicht man diese Zustandsbilder miteinander (Abb. 2—4), so wird man der Meinung von Kurotaki kaum beipflichten können, daß es sich um Artefakte handelt.

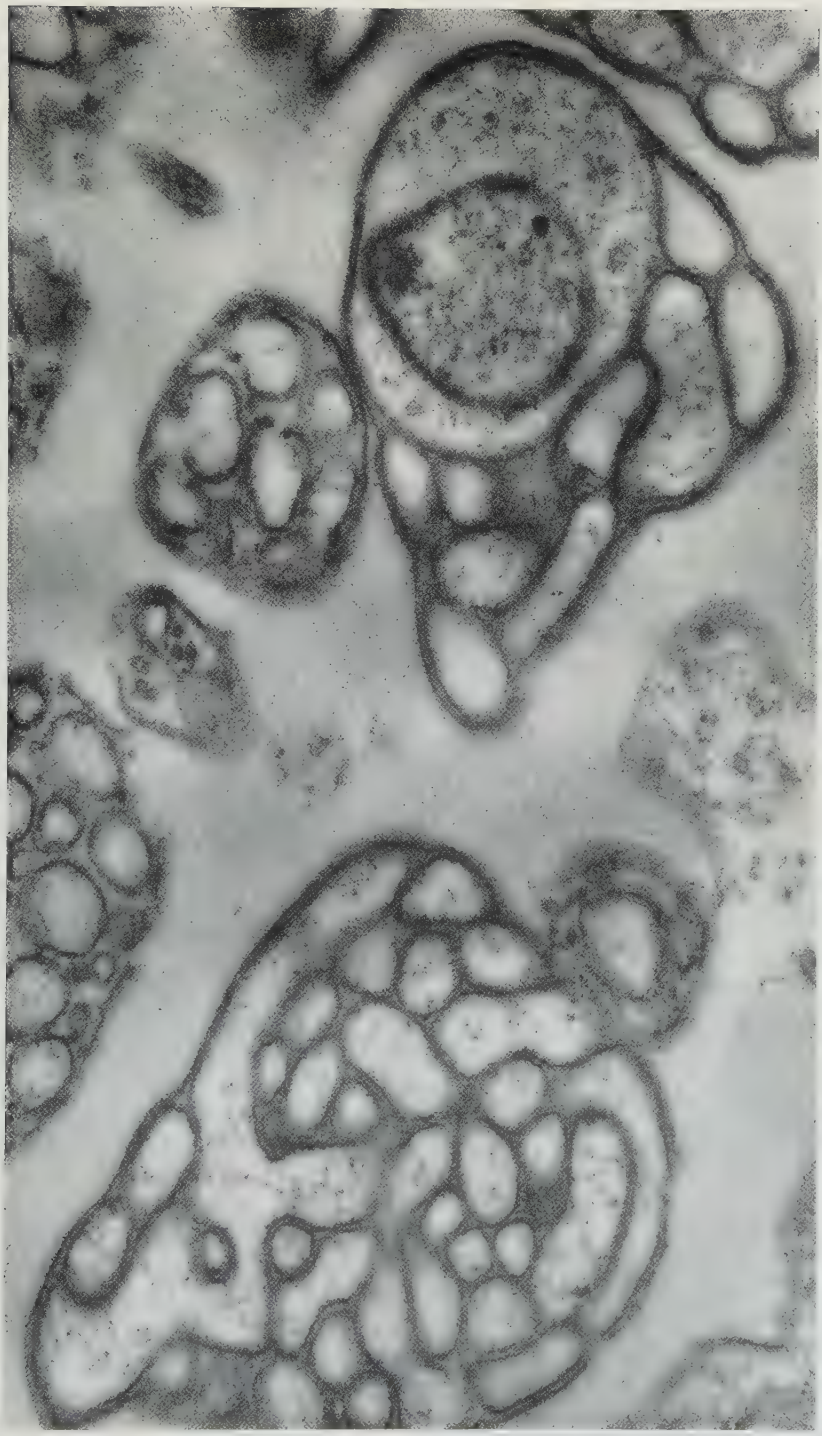


Abb. 5. Gekammerte Endkölbchen von Krönchenzellen aus dem Saccus vasculosus von *Anguilla vulgaris*. Vergr. 52000fach, zur Reproduktion verkleinert

Viele, wenn nicht die meisten Endknöpfchen sind gekammerte Bildungen. Ordnet man diese nach dem Grade der Kammerung, so gelangt man zu einer Reihe, an deren Anfang Knöpfchen mit den Profilen kleiner Kammern (Abb. 2 und 3), an deren Ende Ballons mit nur einer Kammer (Abb. 4) stehen. Zwischen diesen beiden Extremen gibt es sehr verschiedenartige Varianten.

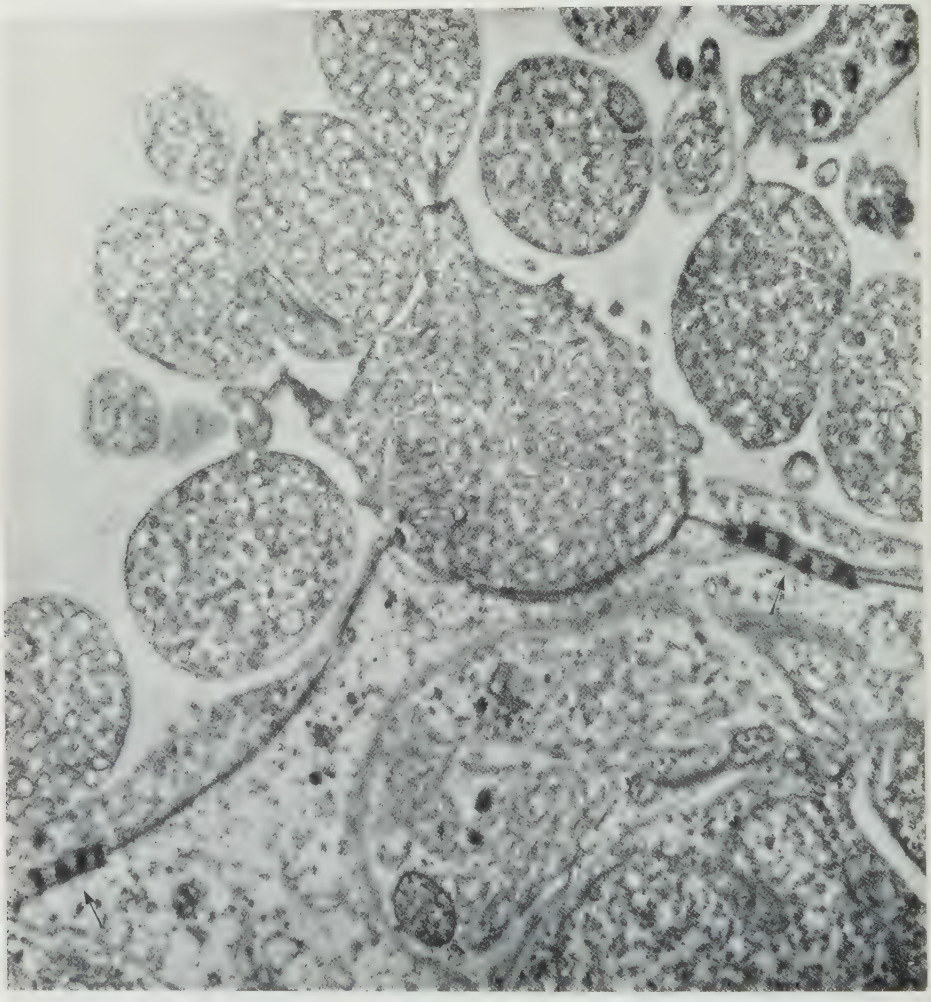


Abb. 6. Anschnitt eines Krönchens im Saccus vasculosus von *Cottus bubalis* und eines Stützzellkragens mit Desmosomen (Pfeile). Vergr. 17 000fach, zur Reproduktion verkleinert

Als kleinste Strukturelemente innerhalb eines vom Plasmalemm umgrenzten Endknöpfchens erscheinen vereinzelte oder kleinere Gruppen mäßig massendichter Partikel, die von einer glatten Membran umschlossen werden. In größeren Kammern findet man diese Teilchen meistens nicht mehr (Abb. 2). Da man außer den kreisrunden oder ovalen Profilen der Kämmerchen auch langgestreckte beobachtet (Abb. 3), die parallel zueinander orientiert sind, darf angenommen werden, daß im Endknöpfchen ein System von gewundenen Schläuchen enthalten ist, dessen Anschnitt das Kammerungsbild hervorruft. Ob es sich dabei um ein

einziges Schlauchkontinuum handelt oder um eine Vielzahl von Schläuchen, können wir nicht entscheiden. Somit muß auch die Frage offen bleiben, ob einzelne sehr große Kammern innerhalb eines Knöpfchens neben kleineren den lokalen Auftreibungen eines Schlauchkontinuums entsprechen oder ob es sich um Vergrößerungen individualisierter Tubuli handelt. Ebenso können wir die Frage nicht beantworten, welche Vorgänge innerhalb eines Knöpfchens zur Entstehung nur einer einzigen großen Blase führen, deren zarte Wandung sich der Innenfläche des Plasmalemms innig anschmiegt (Abb. 4). Eine Reihe von Aufnahmen erweckt den Eindruck, daß sich im Inneren der Knöpfchen Prozesse abspielen, die zum Untergang einzelner Schläuche oder Schlauchabschnitte führen; die Abb. 3 gibt eine verwaschen körnige Substanz innerhalb eines Knöpfchens wieder.

Die prallen Konturen der monolokulären Endknöpfe sprechen unseres Erachtens für deren Füllung mit einer Flüssigkeit oder leicht löslichen Substanz. Ob die Deformierung mancher Blasen auf deren Platzen und damit einer Abgabe ihres Inhaltes an das Saccuslumen zurückzuführen ist oder auf Schrumpfung infolge der Einwirkung der Fixations- und Einbettungsmedien, sei dahingestellt.

Die Endknöpfe sind durch *Stiele* im Halsabschnitt der Krönchenzellen verankert, deren Bau demjenigen von Cilien entspricht. Auf Längsschnitten durch den Stiel

Abb. 7. Desmosom im Epithel des Saccus vasculosus von *Cottus bubalis*. Beachte die Strähnen von Filamenten. Vergr. 81000fach, zur Reproduktion verkleinert

treten parallel verlaufende Fibrillen hervor, auf Querschnitten erkennt man die bekannte Konfiguration von 9, in gleichmäßigem Abstand im Kreise angeordneten Querschnitten von Doppelfibrillen. Zentralfibrillen wurden indessen

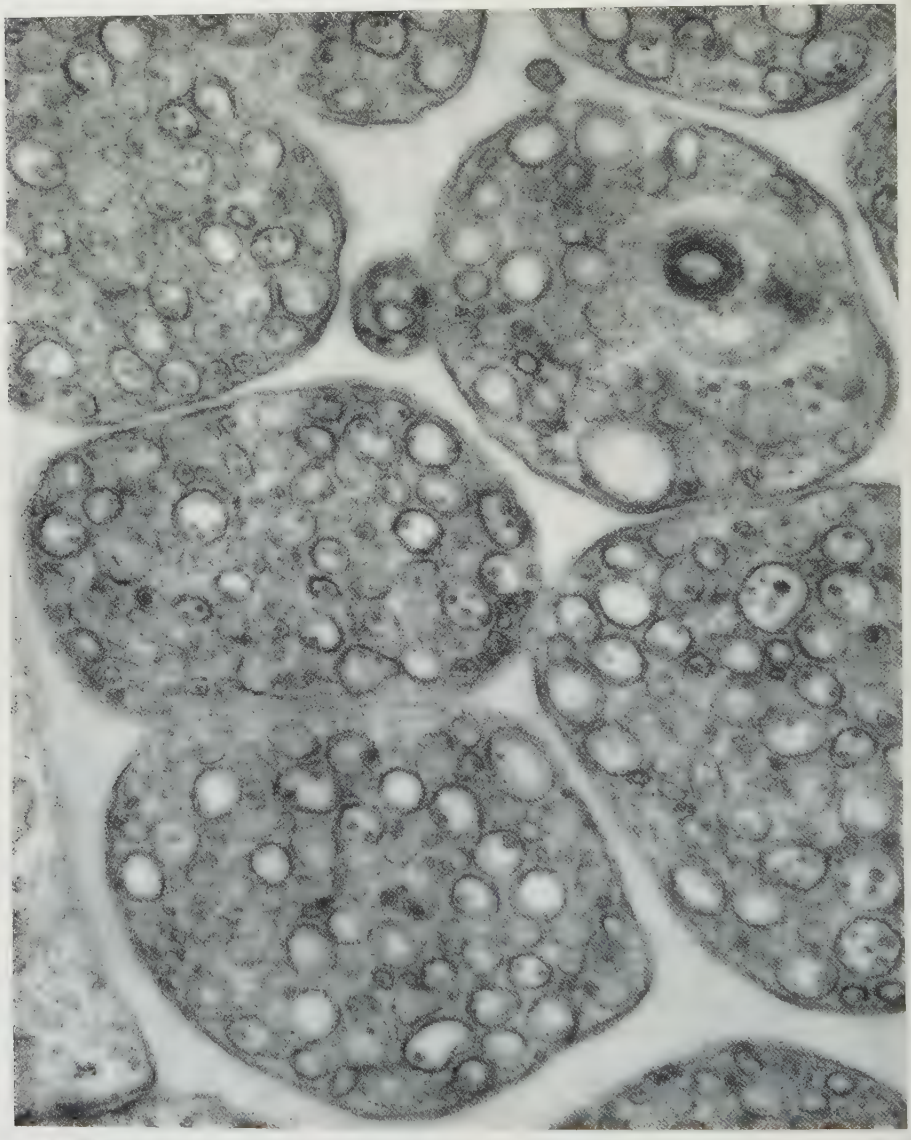


Abb. 8. Endkölbchen von Krönchenzellen im Saccus vasculosus von *Cottus bubalis*. Beachte die kleinen Partikel im Inneren der Bläschen. Vergr. 48000fach, zur Reproduktion verkleinert

vermißt. Über den Feinbau der basalen Verankerung der Stiele geben unsere Aufnahmen keine neuen Auskünfte. Eine periodisch gegliederte Wimperwurzel wurde in einem Falle festgestellt.

2. Raja spec. Die am Saccus vasculosus von *Scylliorhinus* erhobenen Befunde wurden auch bei *Raja* gewonnen. Insbesondere stellt man auch hier eine erstaun-

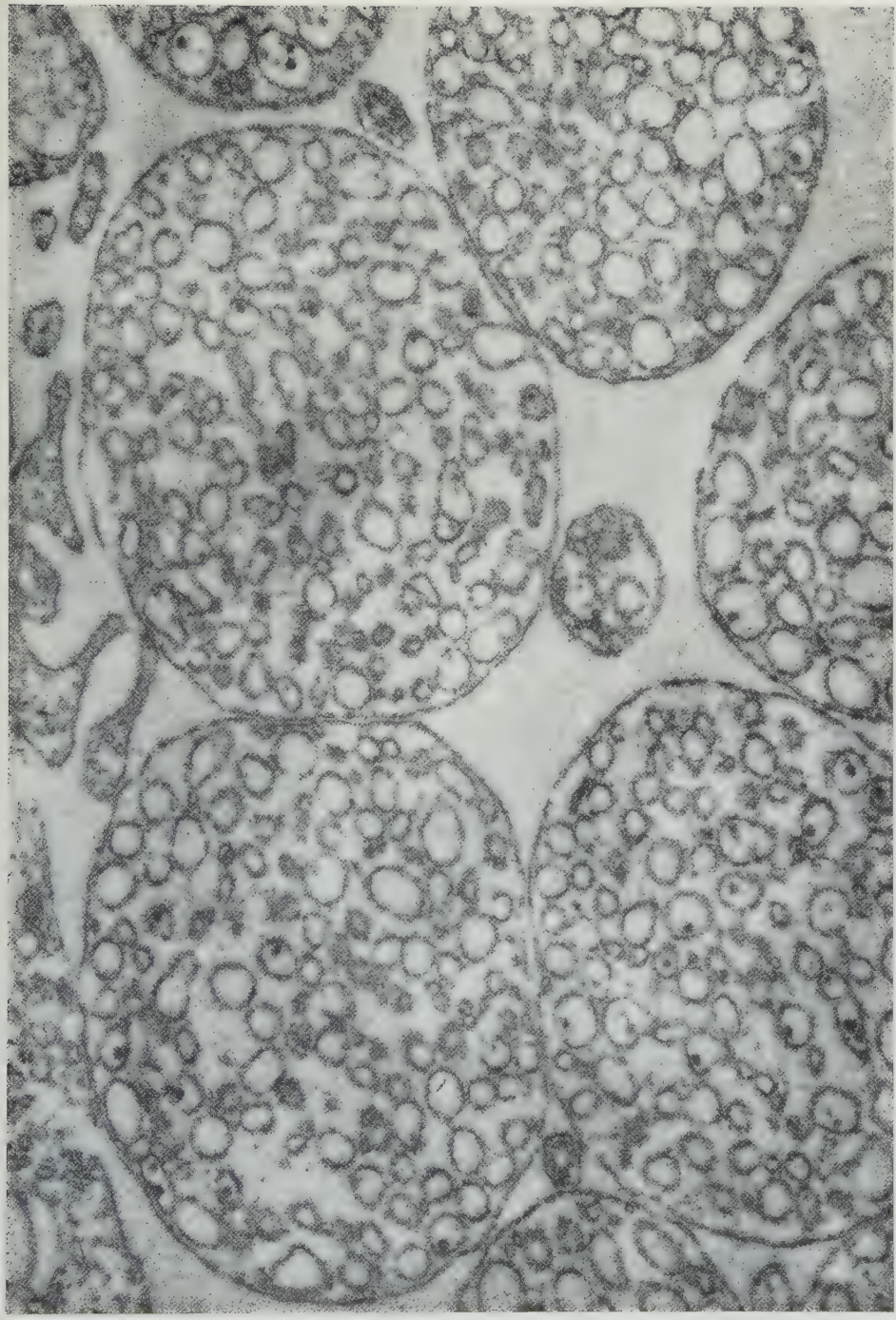


Abb. 9. Endkölbchen im Saccus vasculosus von *Cottus bubalis*. Vergr. 47 000fach, zur Reproduktion verkleinert

liche Polymorphie der Krönchenstruktur fest. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß in den Endkölbchen häufiger als bei *Scylliorhinus* konzentrische Schalen-

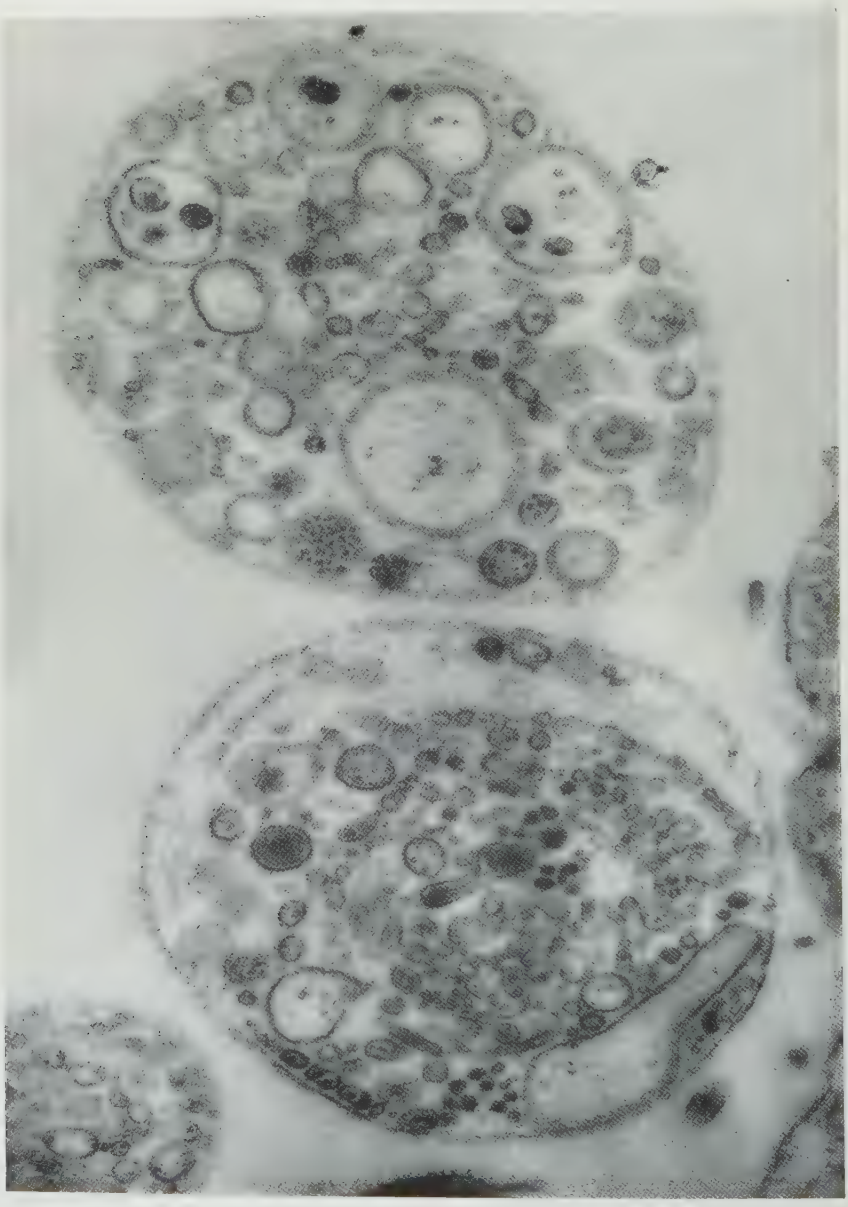


Abb. 10. Endkölbchen im Saccus vasculosus von *Cottus bubalis*. Vergr. 20500fach

strukturen im Inneren von Tubuli oder Bläschen vorkommen. Ferner wurde die Angabe von Bargmann und Knoop (1955) bestätigt, wonach an den Wurzeln der Kölbchenstiele im apikalen Cytoplasma der Krönchenzelle periodisch gegliederte Wimperwurzeln ausgebildet sind. Verdichtungszonen in Kernnähe, die

von Mitochondrien umgeben werden und *feinfibrilläre Wirbelstrukturen* aufweisen, entsprechen möglicherweise den acidophilen Zelleinschlüssen, über die Bargmann (1954) berichtet.

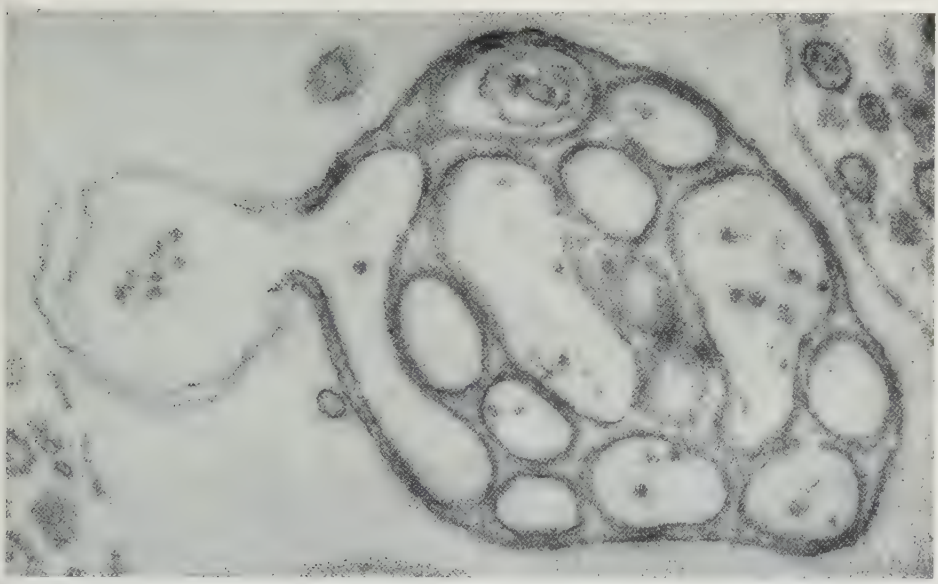


Abb. 11. Einzelnes Endkölbchen einer Krönchenzelle von *Cottus bubalis*. Beachte die hernienartige Ausstülpung. Vergr. 44 500fach

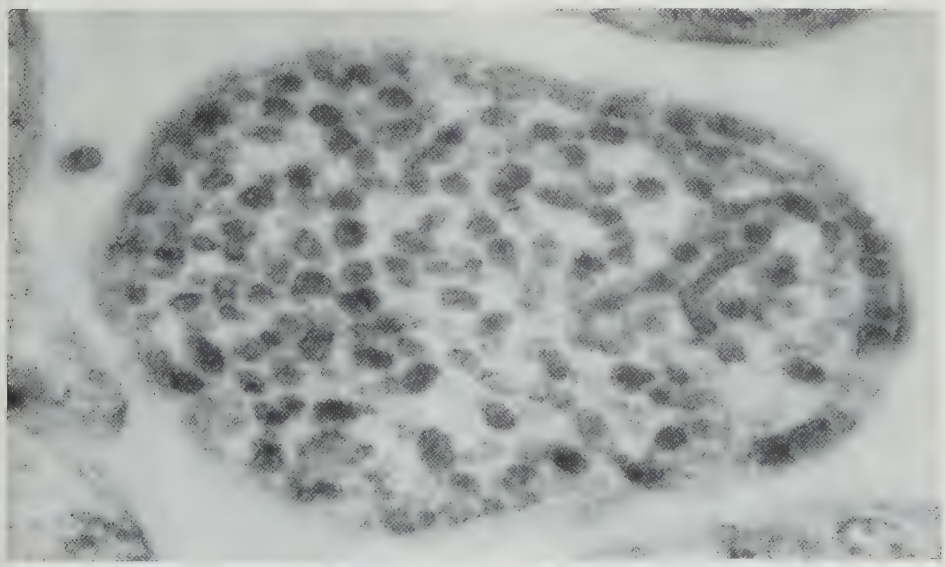


Abb. 12. Einzelnes Endkölbchen einer Krönchenzelle von *Cottus bubalis*. Vergr. 44 500fach

3. Anguilla vulgaris. Ein sehr abwechslungsreiches Bild bieten auch die Zustandsformen der Krönchen im Saccus dieses Teleostiers. Neben zahlreichen kleinen Tubuli mit annähernd gleichem Durchmesser findet man vereinzelte

blasig aufgetriebene Kammern oder gewundene Gänge. Ihr Inhalt (Abb. 5) tritt im elektronenmikroskopischen Bild in Form eines zarten netzigen Gerinnsels

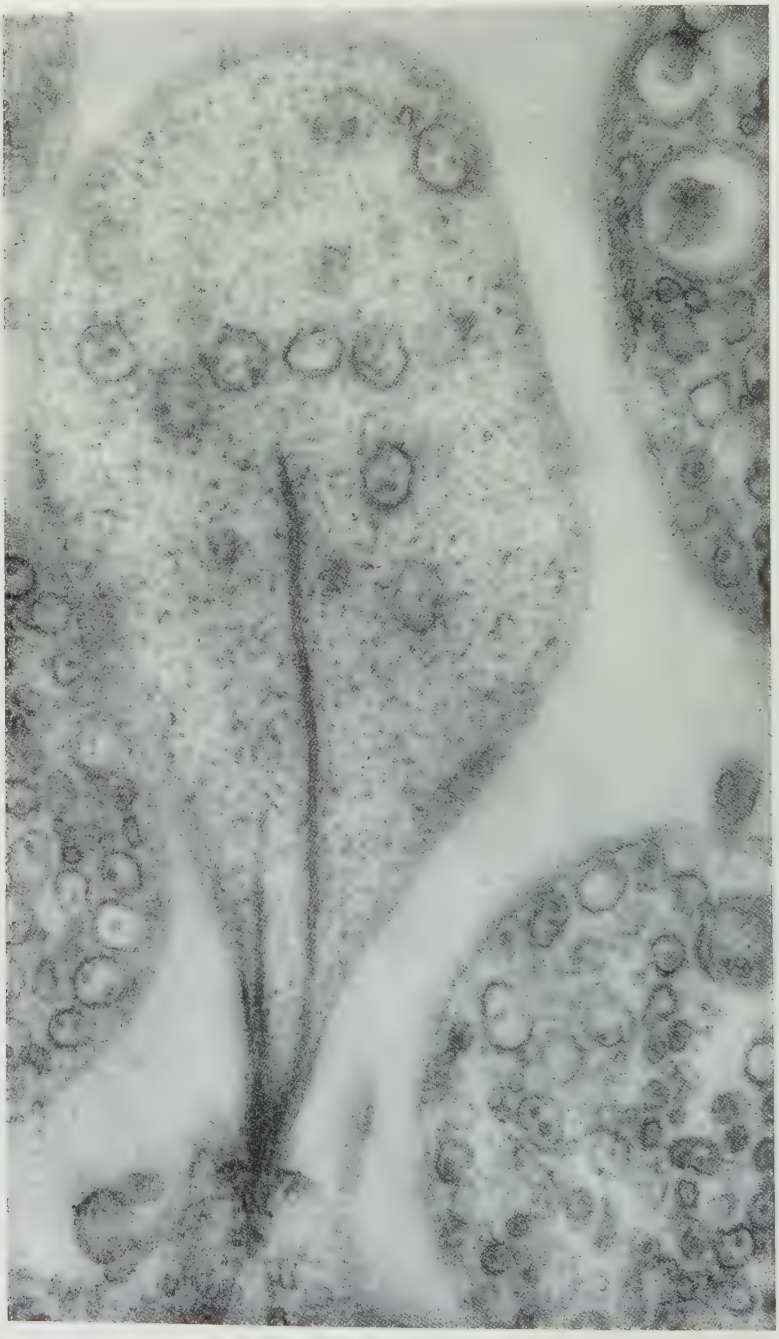


Abb. 13. Endkölbchen mit kurzem Stiel, *Cottus bubalis*. Beachte die relative Strukturarmut des Kölbcheninneren. Vergr. 41000fach

oder unscharf begrenzter Körnchen, manchmal auch in Gestalt kompakter rundlicher Einschlüsse in Erscheinung. Die im Kölbchenstiel enthaltenen Fibrillen kann man unter die Oberfläche des Kölbchenplasmalemms verfolgen.

4. Cottus bubalis. Die Stützzellen im Saccusepithel von *Cottus* bilden ebenfalls kragenartige Umhüllungen der Halsabschnitte der Krönchenzellen, wie sie

Abb. 14. Große Blase im Inneren eines Kölbchens, *Cottus bubalis*. Vergr. 27 000fach, zur Reproduktion verkleinert

für *Scylliorhinus* beschrieben wurden. An den Orten des Kontaktes von Stütz- und Krönchenzellen und der Stützzellen untereinander sind deutliche Desmosomen (Abb. 6) ausgebildet, die sich teilweise über größere Strecken der Zelloberfläche hin ausdehnen. Es handelt sich um Haftplatten, die sich — teils einzeln, teils in Ketten auftretend — aus Schichten verschiedener Dichte aufbauen, in deren tiefste Lage zarte Züge von *Filamenten* aus dem Cytoplasma einstrahlen. Ein Teil der Filamente erreicht, zu dichten Strähnen geordnet, die Desmosomen in tangential zur Zelloberfläche gerichtetem Verlauf (Abb. 7). Erfahrungen an anderen Objekten sprechen dafür, daß die Schichtung der Haftplatten kompli-

zierter sein dürfte, als es in der Abb. 7 erkennbar ist. Den Interzellularspalt scheint eine homogene Substanz von mäßiger Dichte einzunehmen.

Von dem Ausmaß des Strukturwandels, der sich am Krönchenbesatz der Saccuszellen auch von *Cottus* allem Anschein nach vollzieht, zeugen die Abb. 8 bis 16. Dieser Strukturwandel dürfte von Zuständen, wie sie in Abb. 8 wieder-

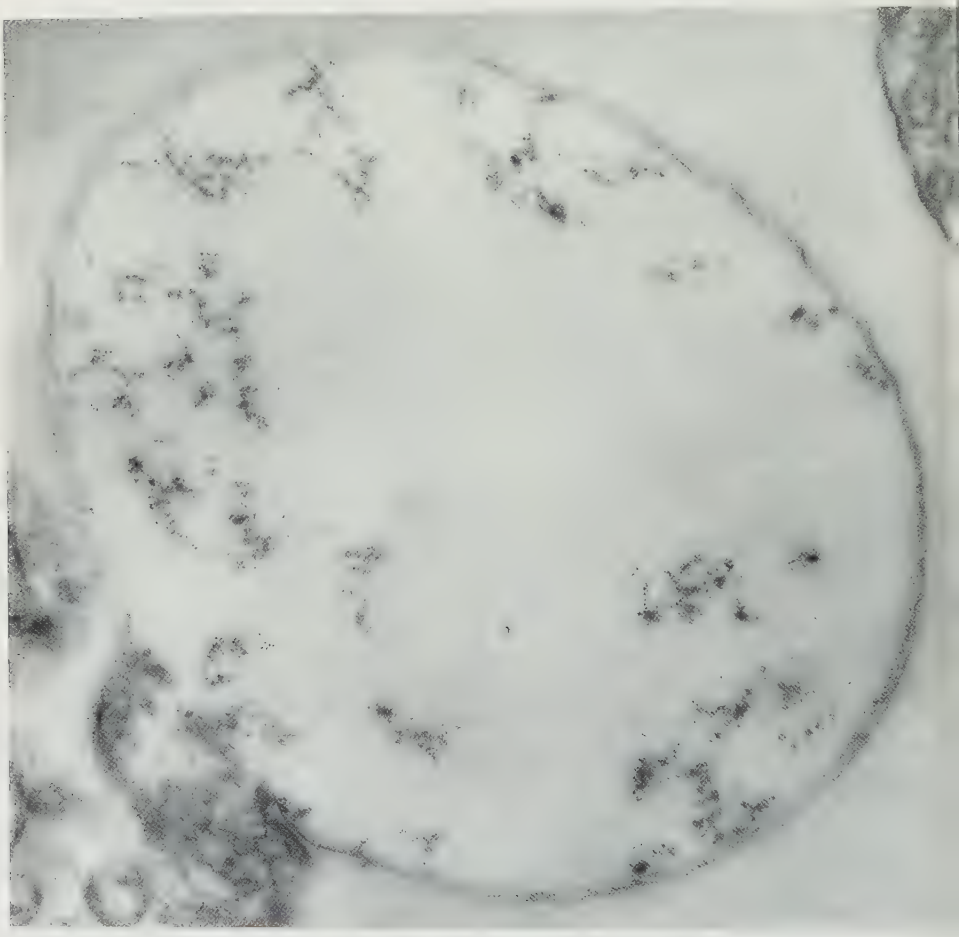


Abb. 15. Zur Blase umgestaltetes Kölbchen, *Cottus bubalis*. Vergr. 70000fach, zur Reproduktion verkleinert

gegeben sind, zu jenen führen, welche die Abb. 14 und 15 veranschaulichen. Die Abb. 8 zeigt, daß die Schnittfläche des Endkölbchens von vielen Profilen eingenommen wird, die teils das Aussehen dichter, von einer Membran umgrenzter Korpuskel besitzen (Durchmesser 300—800 Å), teils jenes von größeren Bläschen (Durchmesser 1000—1600 Å), in deren Lumen Körnchen locker verteilt liegen. In einigen Endkölbchen findet man Granula und Bläschen nebeneinander. Gelegentlich vorkommende, aus feinsten, sehr massendichten Granula bestehende Einschlüsse, die nicht von einer Membran umhüllt sind, verkörpern wahrscheinlich Pigment. Manche Bläschen überragen die ihrer Nachbarschaft erheblich an Größe

und sind zu sackartigen Räumen erweitert, die teils Gerinnsel, teils Körnchen und dichtere, unscharf begrenzte Massen enthalten. Eine besonders umfangreiche Blase (Durchmesser 5—6 μ) zeigt die Abb. 14. Der wiedergegebene Zustand

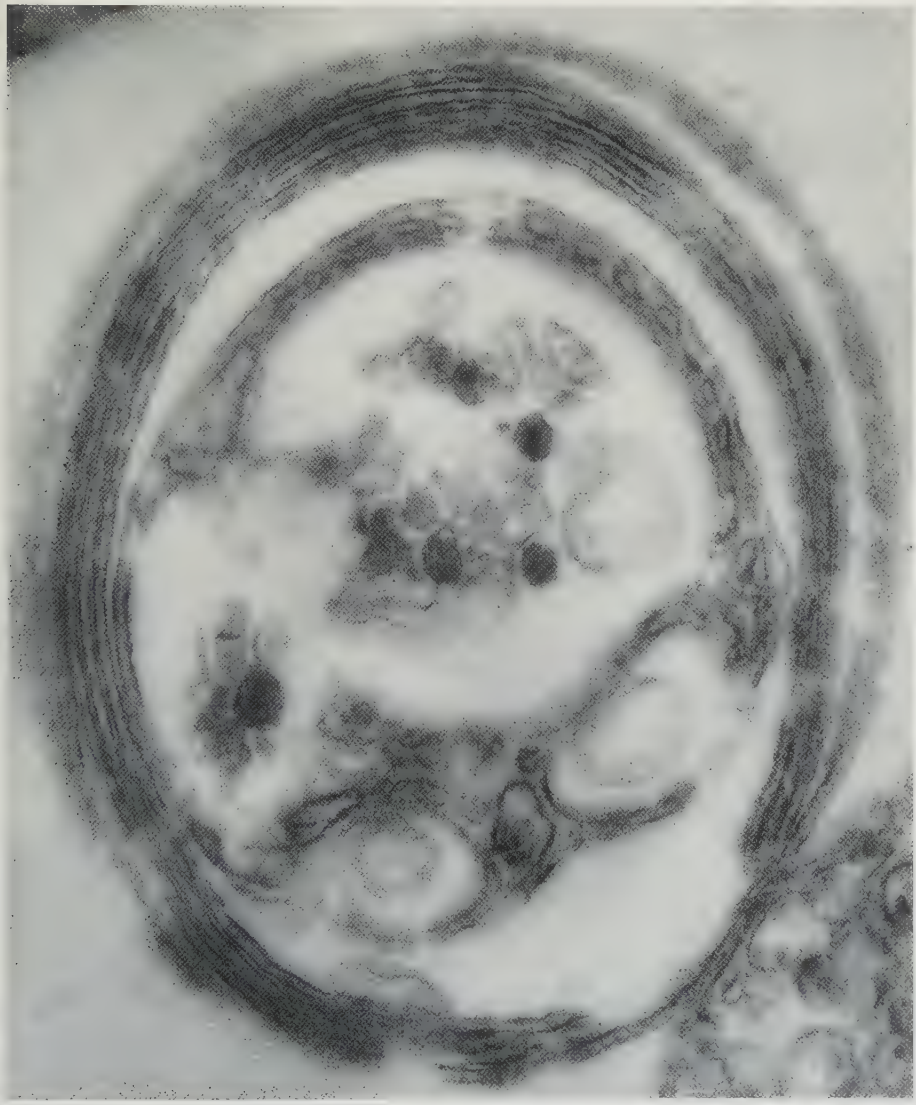


Abb. 16. Endkölbchen im Saccus vasculosus von *Cottus bubalis* mit konzentrischer Schichtung. Vergr. 81000fach, zur Reproduktion verkleinert

dürfte einem Übergangsstadium zur Ballonform (Abb. 15) entsprechen. Bei aller Skepsis gegenüber der Aneinanderreihung von Zustandsbildern halten wir es für gerechtfertigt, auf den Ablauf eines Prozesses im Inneren der Kölbchen zu schließen, der mit Verarmung an Struktur einhergeht und zu einer Anreicherung von flüssiger Substanz im Inneren des zu einem Ballon umgewandelten Kölbchens einhergeht. Auf Grund der bisher vorliegenden histochemischen Unter-

suchungen (s. S. 577) kann angenommen werden, daß diese Substanz saure Mukopolysaccharide enthält. Es ist zu prüfen, ob der Inhalt der Kölbchen durch Platzen ihrer Membran (Plasmalemm, Abb. 11) oder auf andere Weise in den Liquor cerebrospinalis abgegeben wird. Über den Modus der Entstehung konzentrisch geschichteter Gebilde, deren eines die Abb. 16 wiedergibt, können wir nichts aussagen.

Neue Angaben über den Feinbau des *Kölbchenstieles* können wir nicht vorlegen. Wie weit die Stielfibrillen in das Kölbcheninnere hineinziehen, ist aus der Abb. 13 ersichtlich.

5. Untersuchung frischen Saccusgewebes von Cottus bubalis. An dünnen Streifen oder flächenhaft ausgebreiteten Wandstückchen des lebensfrischen Saccus von *Cottus* kann man die Krönchenzellen an ihrem charakteristischen Besatz mit stärkerer Optik gut erkennen. Die apikalen, in die Ventrikellichtung vorgewölbten Zellfortsätze treten als glänzende Kalotten hervor, um die sich die Endkölbchen der Krönchenhaare im Kranze ordnen. Bei Abblendung sieht man auch die zarten Stiele der Kölbchen eindeutig. In keinem Falle ist es den Beobachtern gelungen, Anzeichen einer Motilität am Krönchenbesatz festzustellen, wie man sie an Flimmerzellen bei gleicher Vorbehandlung ohne weiteres nachweisen kann. Es wäre jedoch verfehlt, die Unbeweglichkeit des Besatzes damit als endgültig erwiesen anzusehen. Das Saccusepithel steht im Gegensatz zu den bekannten Flimmerzellverbänden durch einen ausgedehnten Nervenapparat mit dem Gehirn in Zusammenhang, von dem es gewaltsam gelöst wurde. Wir wissen nicht, ob der präparatorische Eingriff eine in vivo vorhandene Motilität zum Stillstand gebracht hat. Indessen hat schon Boeke (1902) am intakten Objekt, nämlich an Muraenoidenembryonen, eine regelrechte Flimmerbewegung der Krönchen nicht beobachten können, so daß wir eine Motilität der Cilien — jedenfalls im Sinne größerer Exkursionen — glauben ausschließen zu dürfen.

Besprechung der Befunde

Kurotaki (1961) ist der Ansicht, die Krönchenzelle besitze eine Struktur ähnlich derjenigen von Sinneszellen. Der Autor stützt sich insbesondere auf die elektronenmikroskopischen Untersuchungen von de Robertis (1955) und de Robertis und Lasansky (1958) an der Retina, ferner von Engström und Wersäll (1958) an den äußeren Haarzellen des Cortischen Organes. Es ist notwendig, die von uns vorgelegten Befunde mit den Angaben von Kurotaki, de Robertis und Lasansky sowie Engström und Wersäll zu vergleichen.

Nach Kurotaki enthält der apikale, die Krönchen tragende Zellfortsatz der spezifischen Saccuselemente "a large concentration of mitochondria". Aus diesem Grunde entspreche dieser Zellabschnitt dem inneren Segment der Retinasinneszellen mit ihrem sog. Ellipsoid. Nach unseren Beobachtungen kommen in dem apikalen Zellteil in der Tat Mitochondrien vor, jedoch nicht in wesentlich größerer Zahl als in anderen Zellbereichen oder gar in einer auffälligen Konzentration. Überdies ist zu bemerken, daß das Vorkommen von Mitochondrien in der Nähe des Basalapparates von Cilien nicht als spezifisch für den Charakter einer Zelle als Sinneszelle gelten muß, sondern auf die Lebensvorgänge an diesen komplizierten Einrichtungen zu beziehen sein dürfte.

Ein Vergleich der kolbenartigen Endverdickungen, die von den Cilien der Krönchenzellen getragen werden, mit den Außengliedern der Retinastäbchen stößt unseres Erachtens auf Schwierigkeiten auch dann, wenn man mit KUROTAKI Krönchenzelle und strukturell nicht ausgereiftes Retinastäbchen ("undeveloped retinal rod") von Säugern nebeneinander stellt. Die Krönchen sind, wie Untersuchungen an nunmehr zahlreichen Spezies (Selachier, Teleostier) übereinstimmend ergeben haben, *endgültig* differenzierte Gebilde. Hervorzuheben ist ferner die Tatsache ihres erstaunlichen Strukturwandels. Er nimmt seinen Ausgang von einem tubulären (BARGMANN und KNOOP 1955) oder granulären Partikel und führt über multiple Bläschen zu großen, zweifelsohne mit Flüssigkeit gefüllten Ballons. Man kann sich schwer vorstellen, daß sich derart tiefgreifende Veränderungen normalerweise und regelmäßig an einem Rezeptor abspielen. Ein Rezeptor ist nach unserer Auffassung auf eine größere Stabilität seiner Struktur angewiesen, als sie dem Krönchenbesatz eigen ist.

Zusammenfassung

1. Elektronenmikroskopische Beobachtungen am Krönchenbesatz der spezifischen Zellelemente in der Wandung des Saccus vasculosus von *Scylliorhinus caniculus*, *Raja spec.*, *Anguilla vulgaris* und *Cottus bubalis* sprechen in Bestätigung früherer Mitteilungen zugunsten der Auffassung, die Krönchenzellen seien sekretorisch aktiv. Der Ansicht von KUROTAKI (1961), die Krönchenzellen seien den Sinneszellen der Retina und des Cortischen Organes vergleichbare Rezeptoren, steht die Tatsache entgegen, daß sich im Inneren der Endkölbchen ein Prozeß vollzieht, der zu ihrer Umgestaltung zu gekammerten Gebilden und zu Blasen führt. Diese Blasen müssen eine flüssige oder leicht lösliche Substanz enthalten. Es kann ferner nicht übersehen werden, daß im Saccuslumen kolloidale Substanzen vorkommen, welche wie die Endkölbchen des Krönchenbesatzes Reaktionen auf saure Mukopolysaccharide geben.

2. Beobachtungen am lebensfrisch untersuchten Saccusepithel eines marinen Teleostiers mit wohlentwickelten Krönchenzellen *(Cottus bubalis)* ergeben keine Anhaltspunkte für das Bestehen einer Motilität der Krönchencilien nach Art der bekannten Flimmerbewegung.

Literatur

BARGMANN, W.: Über Feinbau und Funktion des Saccus vasculosus. Z. Zellforsch. **40**, 49—74 (1954).

—, u. A. KNOOP: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Krönchenzellen des Saccus vasculosus. Z. Zellforsch. **43**, 184—194 (1955).

BOEKE, J.: On the development of the entoderm, of KUPFFERS' vesicle, of the mesoderm of the head and of the infundibulum in muraenoids. Proc. kon. ned. Akad. Wet. **57**, 442—448 (1902).

DORN, E.: Über den Saccus vasculosus einiger Teleostier. Z. Zellforsch. **40**, 612—621 (1954).

— Der Saccus vasculosus. In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, herausgeg. von W. BARGMANN, Bd. IV/2. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.

FAWCETT, D.: Cilia and Flagella. In: The Cell. Ed. by J. BRACHET, Vol. 2. New York and London: Academic Press 1961.

JANSEN, W. F., and J. C. VAN DE KAMER: Histochemical analysis of the Saccus vasculosus of the trout. Z. Zellforsch. **55**, 370—378 (1961).

Kamer, J. C. van de, J. Boddingius and J. Boender: On the structure and function of the saccus vasculosus of the rainbow trout (Salmo irideus). Z. Zellforsch. **52**, 494—500 (1960).

—, and Th. G. Verhagen: The cytology of the neurohypophysis, the saccus vasculosus and the recessus posterior in Scylliorhinus caniculus. Proc. kon. ned. Akad. Wet. C **57**, 358—364 (1954).

Katagishi, M.: Histological observation on the saccus vasculosus of fishes. Arch. histol. japon. **21**, 369—385 (1961).

Kurotaki, M.: The submicroscopic studies of the epithelium of saccus vasculosus in teleosts. Acta anat. Nipponica (Kaibo-Z.) **36**, 277—288 (1961).

Robertis, E. de: Electron microscope observations on the submicroscopic organization of the retinal rods. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, 319—330 (1956).

—, and A. Lasansky: Submicroscopic organization of retinal cones of the rabbitt. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 743—746 (1958).

Stahl, A., et R. Seite: Contribution à l'étude du sac vasculaire des poissons téléostéens. Ann. Histochim. **5**, 113—120 (1960).

Zwillenberg, L. O.: Histochemische Beobachtungen am Saccus vasculosus der Forelle. Z. Zellforsch. **54**, 437—442 (1961).

Professor Dr. W. Bargmann,
Anatomisches Institut der Universität Kiel,
Neue Universität, Eingang F 1

Zeitschrift für Zellforschung 55, 597—609 (1961)

Aus der Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin
(Leiter: Prof. Dr. med. Willy Schwarz)

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AN DEN CHORDAZELLEN VON *PETROMYZON*

Von

W. Schwarz*

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. Juli 1961)

Einleitung

Die Chorda dorsalis von *Petromyzon* besteht aus den Chordazellen, dem Chordaepithel und den Chordascheiden. Die Chordazellen sind große blasige Zellen, die von einer lichtmikroskopisch sichtbaren Membran umgeben sind und sich leicht isolieren lassen. Man kann daraus schließen, daß keine zwischenzellige Substanz vorhanden ist. Diese gut ausgebildete Zellmembran läßt feine Streifen erkennen, die als Tonofibrillen aufgefaßt werden. Im Innern der Zellen befindet sich ein Hohlraum, der eine Flüssigkeit enthält, die reich an Glykogen und Lipoiden ist. Das Cytoplasma soll diese Flüssigkeitsansammlung in geringer Dicke umhüllen und der Membran innen aufliegen. Nur in der Kernregion ist das Cytoplasma in deutlich erkennbarer Menge vorhanden. Die Chordazellen liegen eng aneinandergepreßt und haben nach den Untersuchungen der meisten Autoren keine lichtmikroskopisch sichtbaren Interzellularbrücken. Nur Studnička (1897) hat bei *Myxine* und *Petromyzon* Verbindungen der großblasigen Chordazellen gesehen und als Interzellularbrücken bezeichnet. Beim Chordaepithel handelt es sich um Zellen mit einem dichten Cytoplasma, die innen der Chordascheide anliegen. Aus ihnen haben sich die großblasigen Chordazellen entwickelt; deshalb werden diese Zellen des Chordaepithels auch als Chordoblasten bezeichnet.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen liegen nur über die Chordazellen an Hühnchenkeimscheiben und an Kaninchenembryonen vor. Duncan (1957) findet bei 24—72 Std alten Hühnchenkeimscheiben die Mitochondrien in den Chordazellen etwas unregelmäßiger gebaut als in den Zellen des Neuralrohres. Das endoplasmatische Reticulum ist in den Chordazellen sehr spärlich ausgebildet. Leeson und Leeson (1958) finden bei Kaninchenembryonen zuerst eine epithelartige Anordnung der Chordazellen. Später ist jedoch ein netzartiger Verband der Zellen festzustellen, der mit dem Reticulum der Schmelzpulpa in den Zahnanlagen verglichen wird. In diesem Chordareticulum bleiben die Zellgrenzen aber immer erkennbar, so daß von einem eigentlichen Syncytium nicht gesprochen werden kann. Diese Umgestaltung zu einem Reticulum hat anscheinend eine morphogenetische Bedeutung in der Embryonalentwicklung der Wirbeltiere. Bei *Petromyzon* bleibt bei den Chordazellen die Umwandlung der dichten Packung in ein Retikulum aus. Hier behält die Chorda ihre Bedeutung als kranio-kaudales Achsenskelett auch beim erwachsenen Tier. Durch expansiven Druck der dicht-

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

gepackten Chordazellen, die durch die korsettartige Chordascheide zusammengepreßt werden, entsteht ein biegungsfähiger Stab. Diese Konstruktion reicht für die schlängelnden Bewegungen beim *Petromyzon* aus, die z. B. beim Aal von der Wirbelkette mit ihren vielen Gelenken geleistet wird. Die Beanspruchung der blasigen Chordazellen ist bei erwachsenen *Petromyzonten* deshalb besonders groß. Für ihre Funktion ist neben dem Inhalt der intrazellulären Höhle auch noch die Stabilität der Hohlraumbegrenzung von Bedeutung. Dieses in der Lichtmikroskopie als Membran bezeichnete Gebilde ist aber in den Chordoblasten noch nicht vorhanden. Von besonderem Interesse ist deshalb der Ort dieser Membranbildung. Wird bei den Chordazellen diese Membran unter oder über der Zelloberflächenmembran gebildet? Diese Frage ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Die Beantwortung würde nicht nur für die Einordnung des Chordagewebes in die Gruppe der Stützgewebe von Bedeutung sein.

Material und Methoden

Die Chordae dorsales von 30—40 cm langen Neunaugen (*Petromyzon fluviatilis*)[1] wurden in einer 1%igen OsO_4-Lösung nach Palade und in einer 2%igen $KMnO_4$-Lösung nach Luft fixiert. Die Fixierungsmittel waren mit einem Veronalazetatpuffer auf verschiedene p_H-Werte eingestellt (7,4—8,0).

Einbettung: Butyl-Methylmethacrylat 30:70. Die Schnitte wurden hergestellt am Porter-Blum-Mikrotom und Ultrotom (LKB). Kontrastierung: PWS, Uranylazetat und Bleihydroxyd. Aufnahmen: Zeiss-Elektronenmikroskop Typ EM 8/II (Strahlenspannung 40 kV) und Siemens-Elmiskop I (Strahlenspannung 60 kV).

Befunde

Das Chordaepithel besteht aus zylindrischen oder polygonalen Zellen, die der Chordascheide innen anliegen (Abb. 1). Die Zelloberflächenmembran hat eine Dicke von 70 Å. Alle Zellen liegen mit ihren Oberflächenmembranen dicht aneinander, doch sind an vielen Stellen noch besonders ausgebildete Kontaktstellen vorhanden. Diese als Desmosomen bekannten Strukturen haben eine Breite von ungefähr 1000 Å. Sie bestehen aus einem intraplasmatischen und extrazellulären Teil. Der extrazelluläre Teil liegt als dichte Zone zwischen den beiden benachbarten Zelloberflächenmembranen, die hier einen Raum von 150 Å Weite zwischen sich fassen. Der intraplasmatische Abschnitt des Desmosoms zeigt eine Gliederung. Unter der 70 Å dicken Zelloberflächenmembran liegt ein weniger elektronendichter Spalt von 70 Å Tiefe. Darauf folgt in Richtung Zellzentrum eine 100 Å tiefe, sehr dichte Zone. Im Zytoplasma liegen wenige Mitochondrien verstreut, die in zwei Formen vorkommen. Man sieht lange und gebogene Mitochondrien mit typischen und reichlich ausgebildeten Cristae. Daneben kommen kleinere Mitochondrien vor, die eine ovale Gestalt und weniger Cristae haben. Das endoplasmatische Reticulum ist stark ausgebildet und füllt eine großen Teil der Zelle aus (Abb. 2). Das Bild erinnert an Drüsenzellen mit einem ausgeprägten Ergastoplasma. Die Membranen tragen einen Besatz von RNS-Granula, die einen Durchmesser von 130 Å haben. Nach innen, zur Chordamitte hin, werden die Zellen größer. Das endoplasmatisehe Reticulum zeigt hier eine Aufgliederung in Lamellengruppen (Abb. 1). Häufig findet man nur zwei Gruppen, die an den

[1] Herrn Dr. Wiehr (Deutscher Fischerei-Verband E.V., Hamburg) danke ich für das Material.

beiden Polen des Zellkernes liegen. In diesen Zellen tritt unter der Zelloberflächenmembran eine fädige Struktur auf (Abb. 3). Diese Filamente werden in

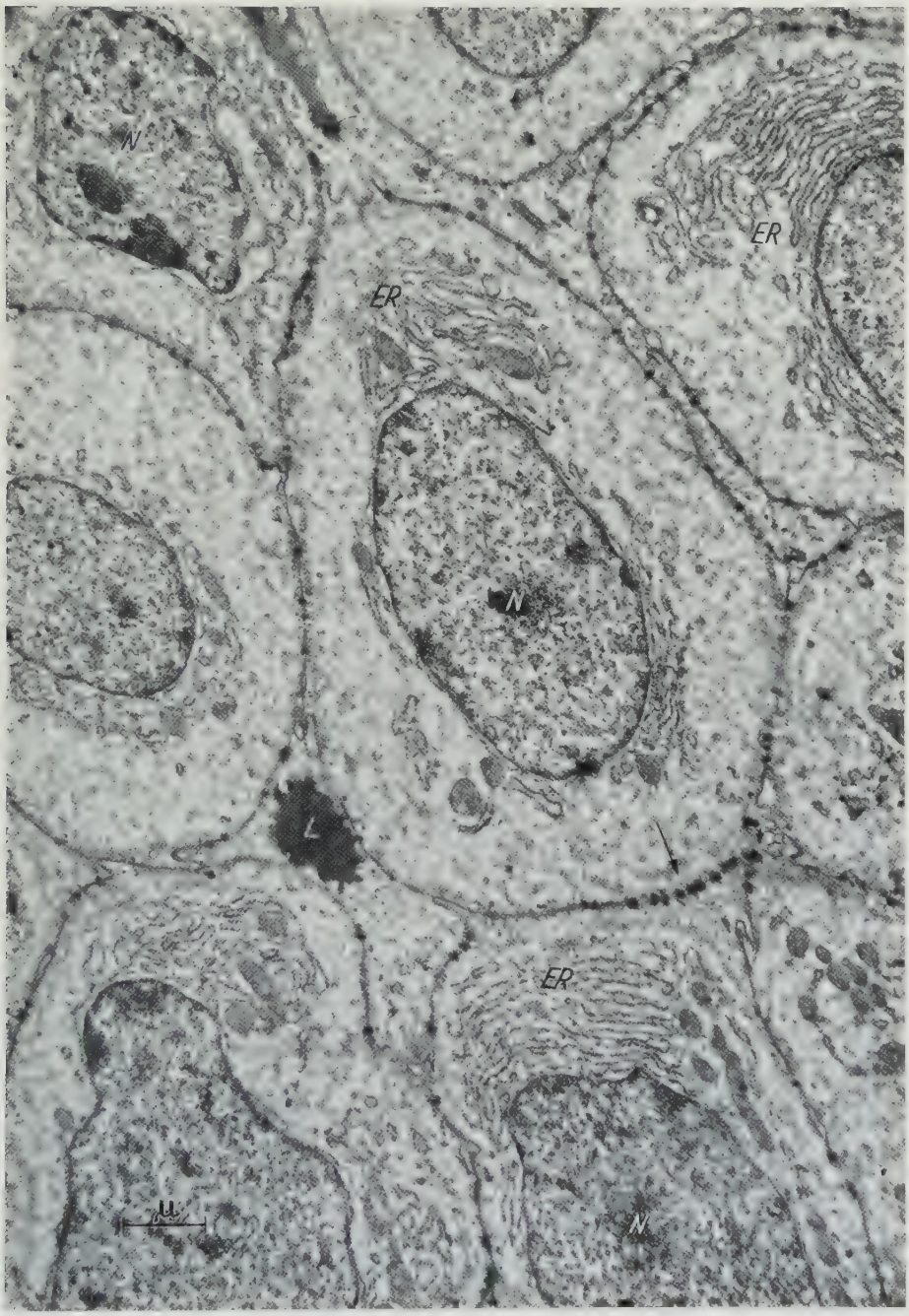


Abb. 1. Flachschnitt durch das Chordaepithel von *Petromyzon*. Osmiumfixierung. Nachkontrastiert mit Uranylazetat. *N* Nukleus, *ER* endoplasmatisches Retikulum, *L* Lipoid. Zelloberflächenmembranen mit Desmosomen (↓). 1:10000

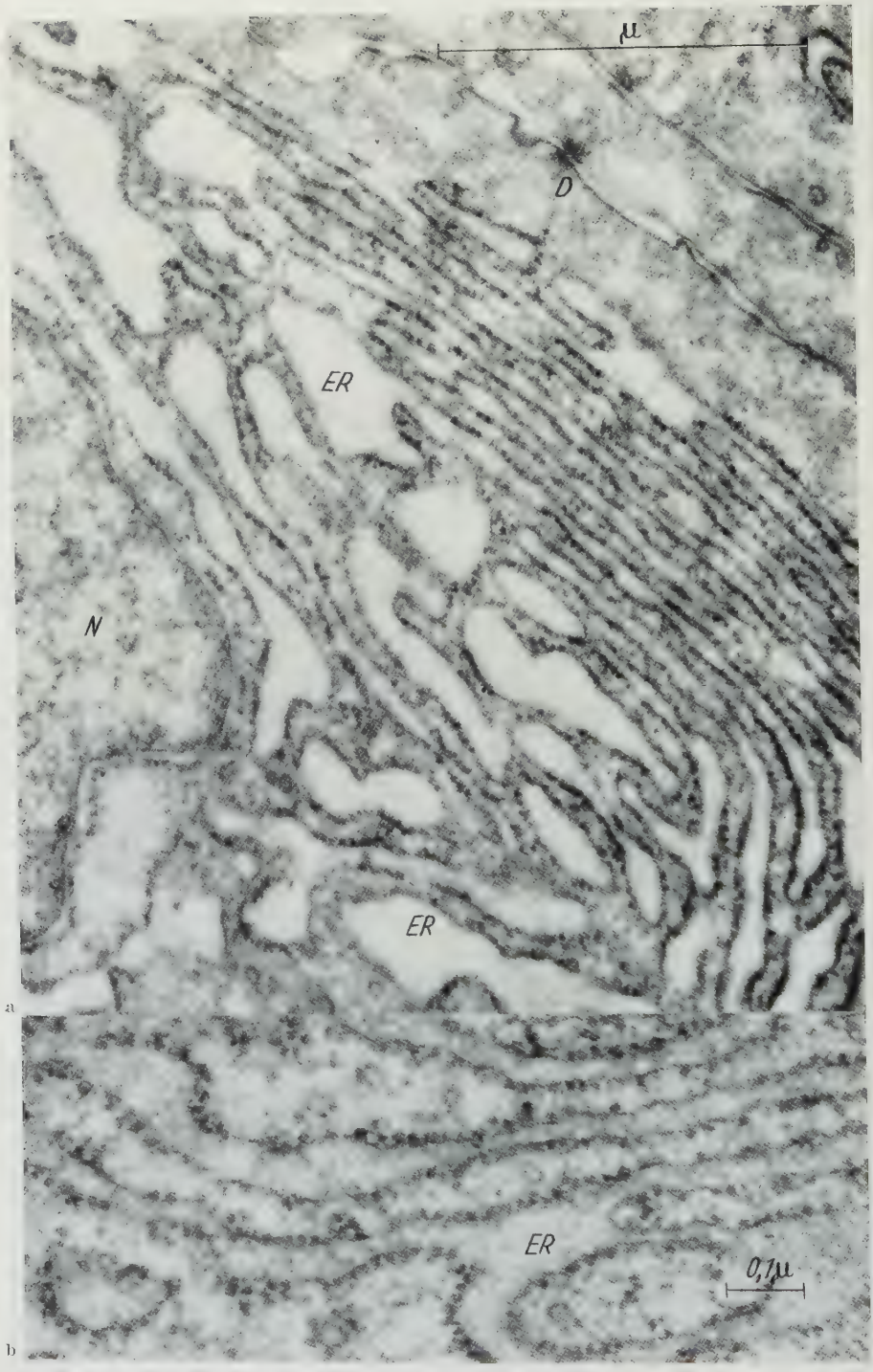


Abb. 2 a u. b. Endoplasmatisches Retikulum mit RNS-Granulabesatz in Chordaepithelzellen von *Petromyzon*. Osmiumfixierung. Nachkontrastiert mit Bleihydroxyd. a 1:50000, b 1:100000

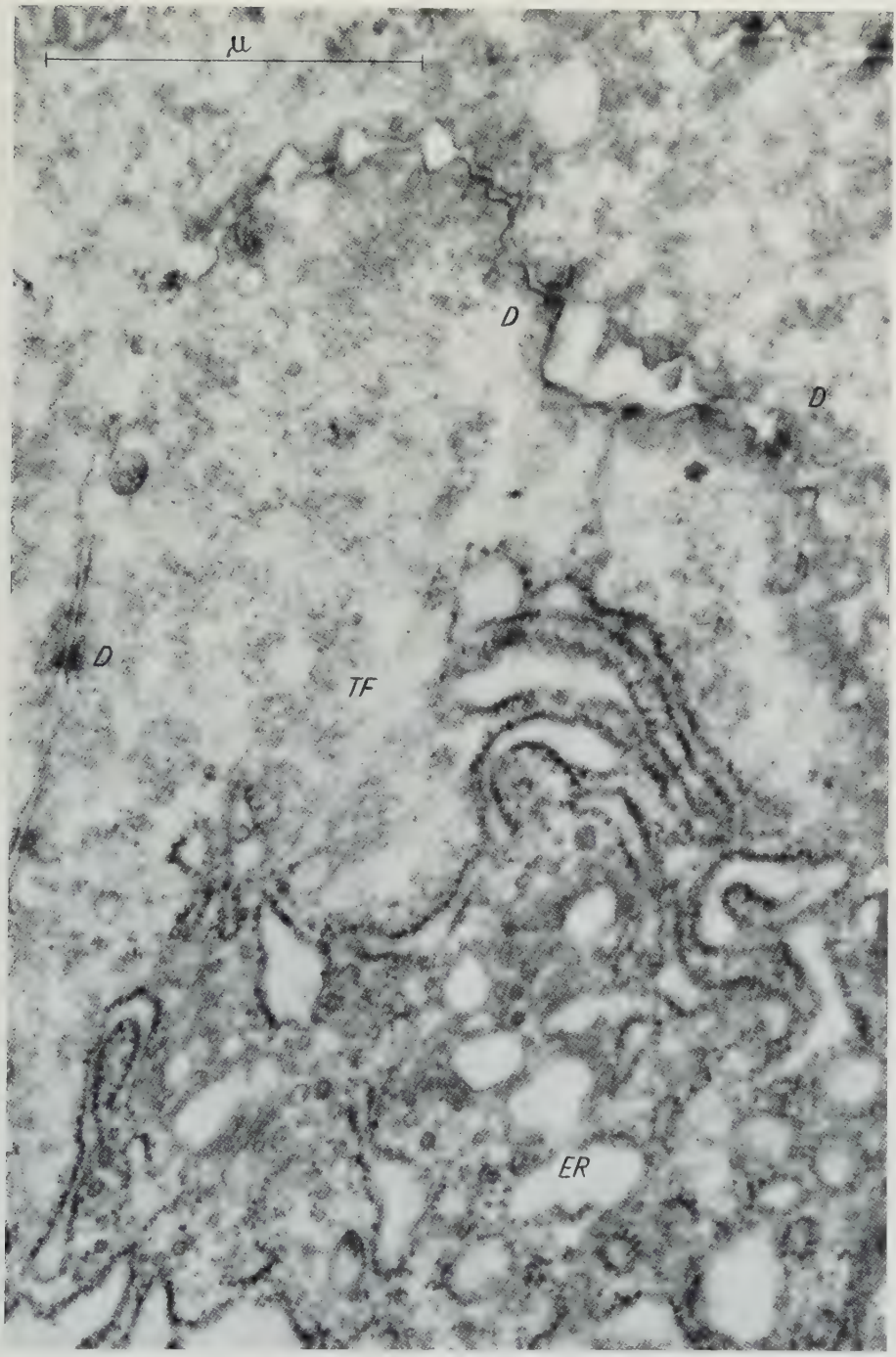


Abb. 3. Chordaepithelzelle von *Petromyzon*. Osmiumfixierung. Nachkontrastiert mit Bleihydroxyd. Bildung der Tonofilamente. *TF* Tonofilamente. 1:50000

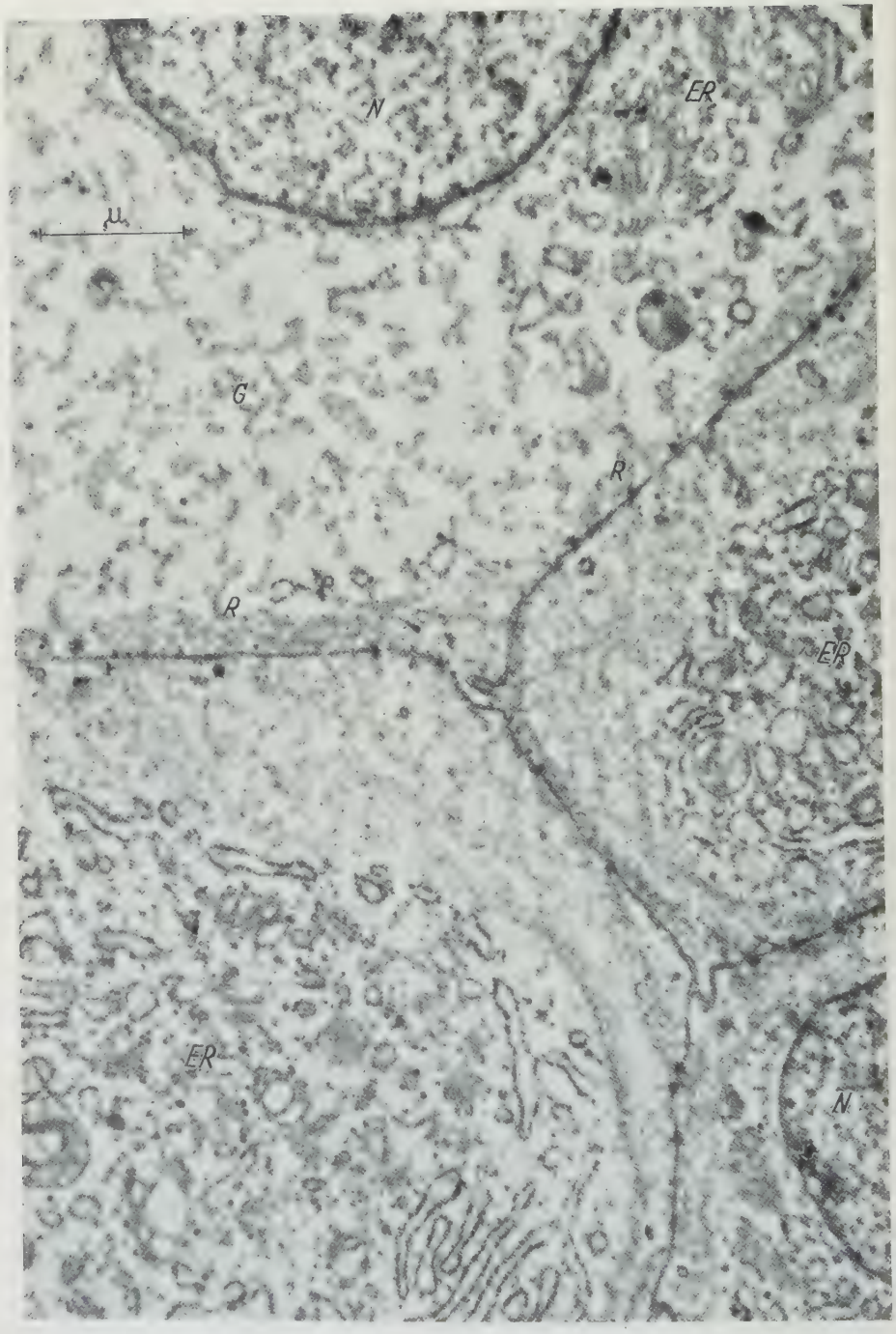


Abb. 4. Grenze zwischen Chordaepithel und blasigen Chordazellen. Osmiumfixierung. Nachkontrastiert mit Uranylazetat. Zerfall des endoplasmatischen Retikulums in vesikuläre Strukturen. Auftreten von Glykogen (*G*) und Rindensubstanz (*R*). 1:20000

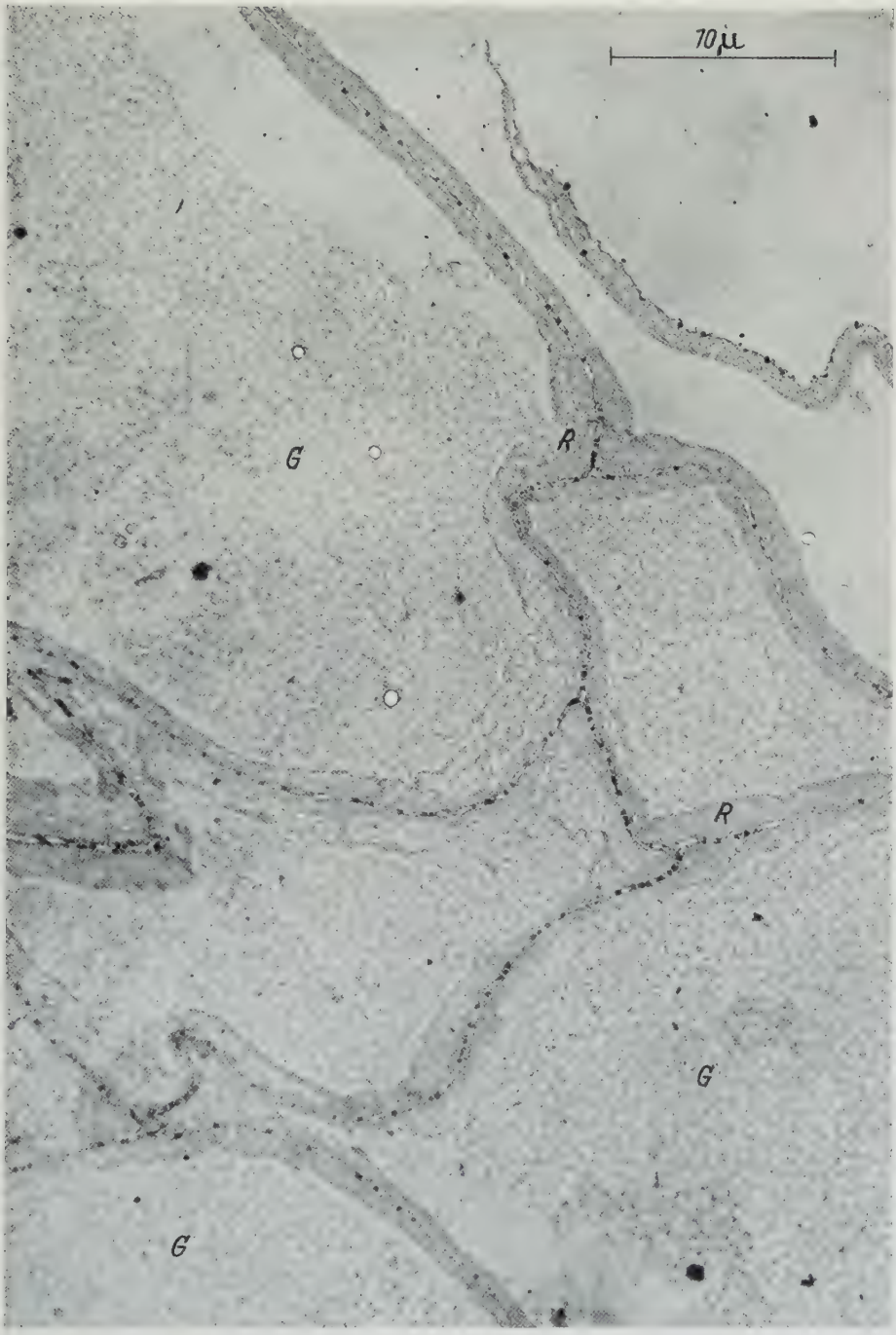


Abb. 5. Blasige Chordazellen mit Desmosomen (*D*). Zellrinde und Glykogen. Osmiumfixierung. 1:3750

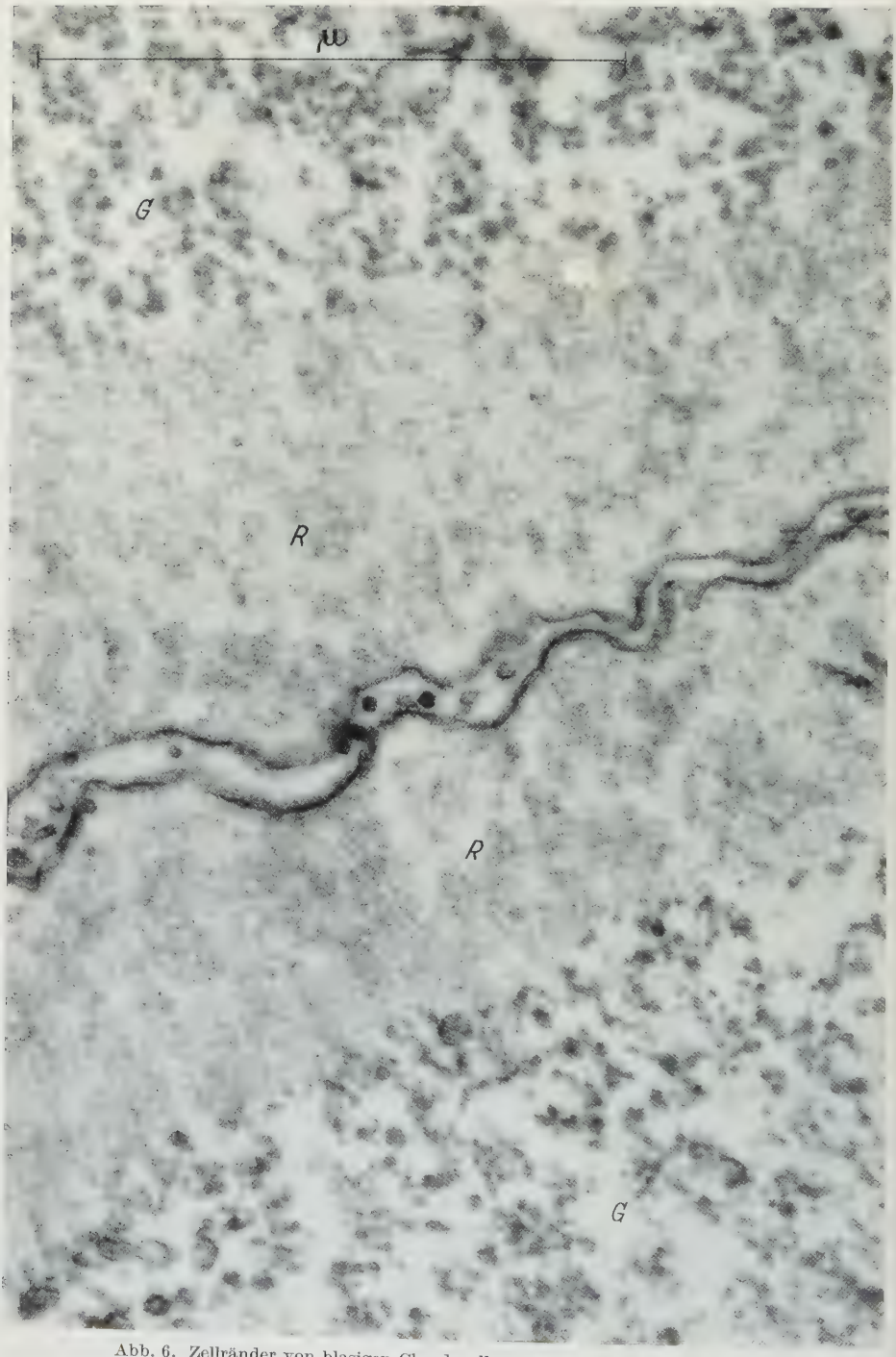


Abb. 6. Zellränder von blasigen Chordazellen. $KMnO_4$-Fixierung. 1:80000

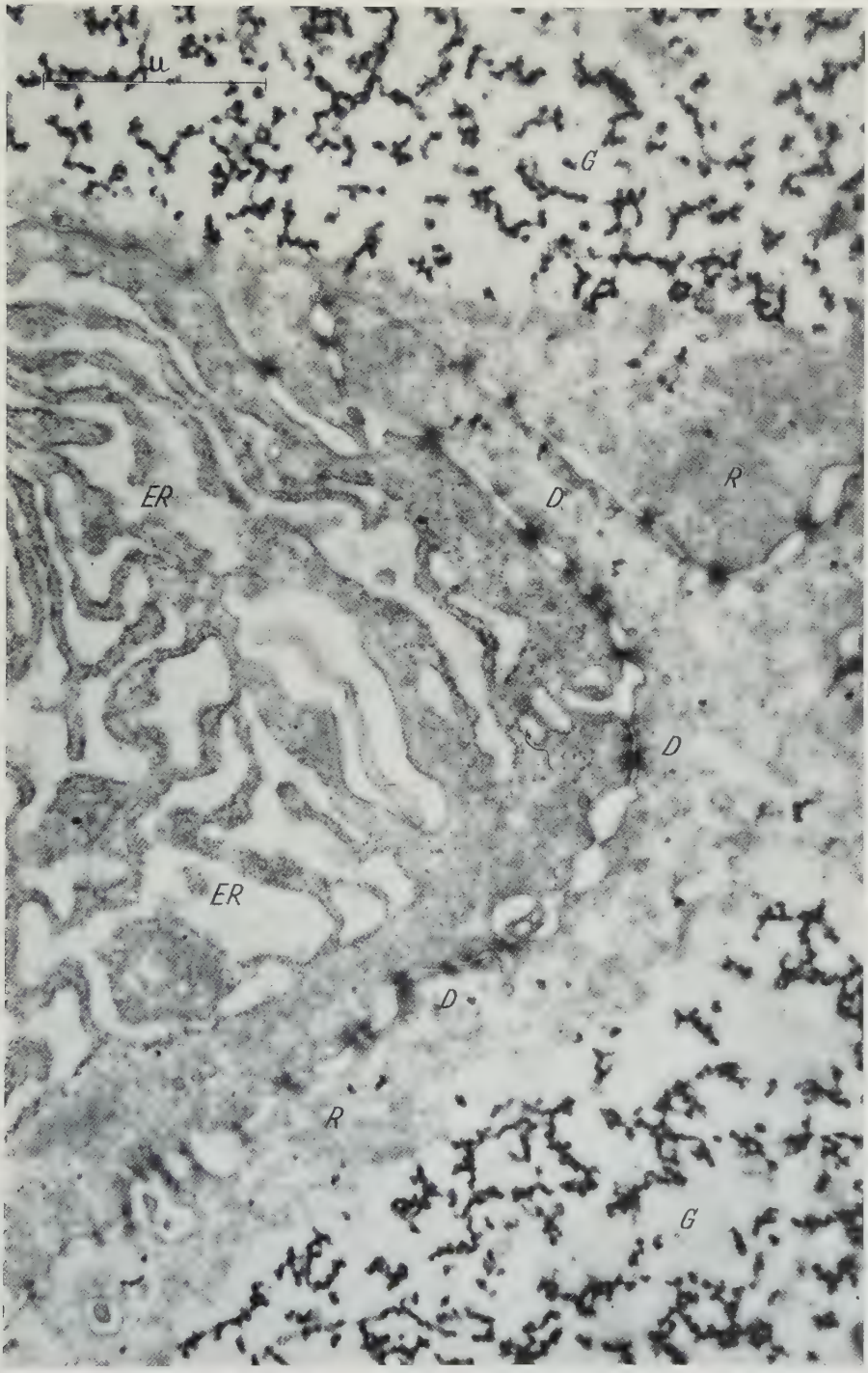


Abb. 7. Chordaepithelzelle und blasige Chordazellen. OsO_4-Fixierung. Färbung des Glykogen mit Bleihydroxyd. 1:30000

den Zellen zur Chordamitte hin stark vermehrt. Gleichzeitig tritt im Zentrum der Zelle ein Bläschen auf. Dieser Hohlraum nimmt zur Chordamitte hin erheblich

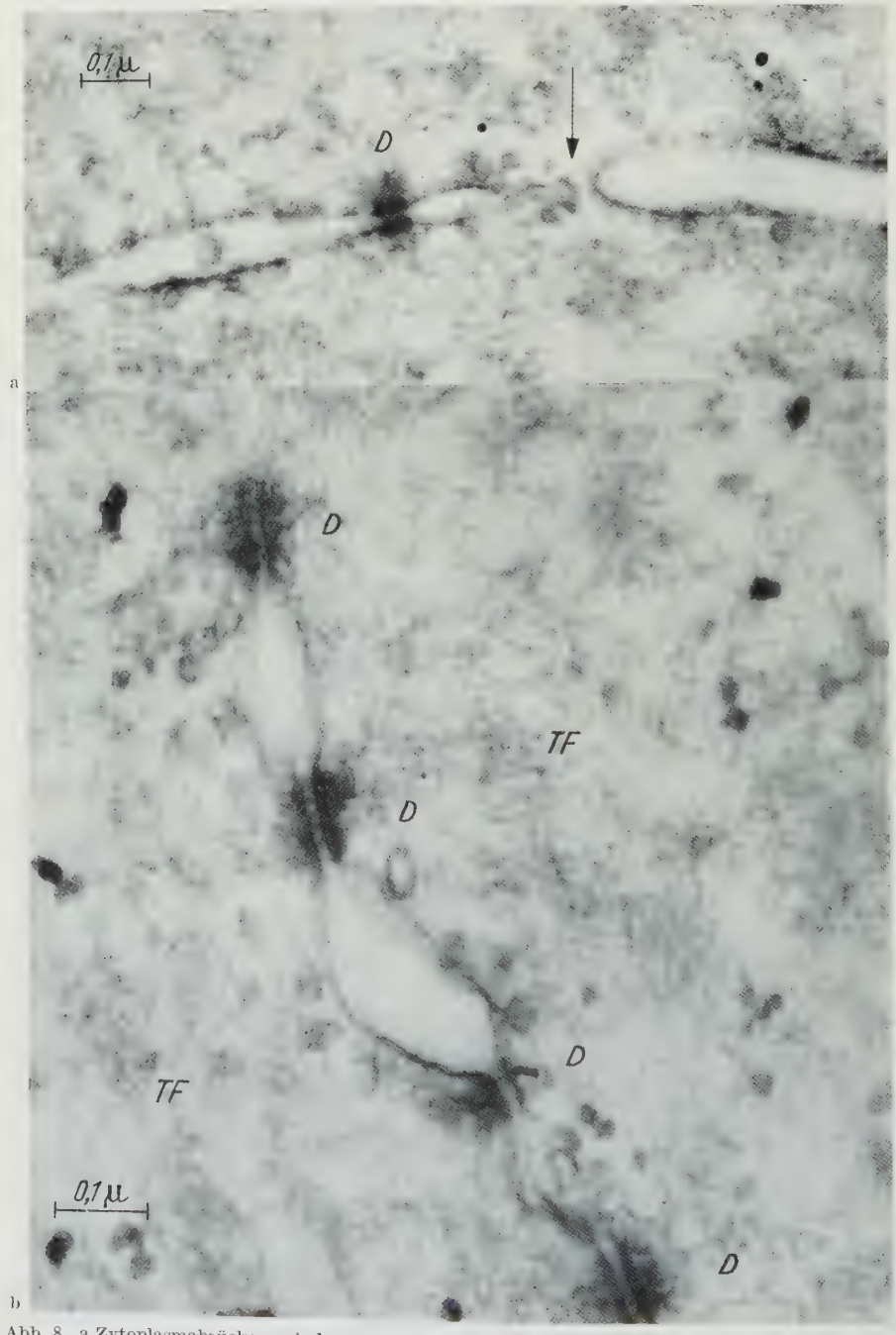


Abb. 8. a Zytoplasmabrücke zwischen zwei Chordazellen (↓). Daneben ein Desmosom. 1:90000. b Desmosomen zwischen zwei blasigen Chordazellen. Tonofilamente in der Rindenschicht. Osmium- fixierung. Nachkontrastiert mit Bleihydroxyd. 1:126000

an Größe zu (Abb. 4). Dabei zerfällt das verzweigte endoplasmatische Retikulum in isolierte Bläschen, die noch einen Granulabesatz haben. Anscheinend zerfallen auch diese Bläschen noch in kleinere, die teilweise frei von Paladegranula sind. In ihrer Nähe treten die Glykogenpartikel auf (Abb. 4). Auch die Zellrinde mit ihren Filamenten unter der Zelloberflächenmembran wird dicker. Die eigentlichen Chordazellen haben im Innern einen sehr großen Hohlraum, der nicht von einer eigenen Membran begrenzt wird (Abb. 5). Die Einfassung ist die filamentreiche und unter der Zelloberflächenmembran gelegene Zytoplasmaschicht. Ein Inhalt des Zellbläschens ist nach Osmiumfixierung kaum zu erkennen (Abb. 5). Nach $KMnO_4$-Fixierung lassen sich aber im Hohlraum Granula mit einem Durchmesser von 350 Å darstellen (Abb. 6). Die Kontrastierung mit Bleihydroxyd färbt diese zahlreichen Granula besonders gut an, die dann einen Durchmesser von 300 Å haben (Abb. 7). Mitunter liegen die Granula zu Stäbchen geordnet vor, die einen Durchmesser von 300 Å und eine unbestimmte Länge haben. Die zentralgelegene Chordazellen enthalten in ihrer blasigen Vakuole häufig keinen elektronenmikroskopisch sichtbaren Inhalt.

Die äußere Begrenzung jeder blasigen Zelle ist wieder die typisch ausgebildete osmiophile Zelloberflächenmembran, die auch hier an diesen Zellen eine Dicke von 70 Å hat. Unter dieser Zelloberfläche kommt eine Schicht, die sehr viel Filamente enthält. Sie haben eine Dicke von 25 Å und verlaufen meistens annähernd parallel zur Zelloberfläche (Abb. 8). Die Stärke dieser filamentreichen Schicht ist bei den blasigen Chordazellen beträchtlich und erreicht die lichtmikroskopisch eben sichtbare Größe von 0,5 μ und mehr. Alle großen blasigen Chordazellen sind ebenfalls durch Desmosomen miteinander verknüpft. Die Breite der Desmosomen beträgt meistens 1000 Å. Auch hier kann man wieder einen extra- und intrazellulären Teil unterscheiden (Abb. 8). In der Kontaktzone liegt zwischen den beiden Zelloberflächen eine elektronendichte Schicht, die nicht völlig homogen ist. Dunklere Streifen durchziehen diese Schicht von einer Zelle zur anderen. Neben diesen Streifen kommt noch eine Zickzackzeichnung vor. Die Spaltbreite beträgt hier 150 Å. Unter der 70 Å dicken Zelloberflächenmembran liegt eine helle Schicht von 70 Å Dicke. Nach der Zellmitte hin folgt wieder eine sehr elektronendichte Schicht von 100 Å Dicke. Aus dem Zellinnern läuft in der filamentösen Schicht ein 400 Å langes Büschel von Filamenten auf diese dunkle Kontaktschicht zu. Mit $KMnO_4$-Fixierung lassen sich diese Desmosomen nicht darstellen. An sehr wenigen Stellen sind bei den dicht aneinanderliegenden Zellen die Zelloberflächenmembran unterbrochen und das Zytoplasma der einen Zelle geht in das der anderen Zelle kontinuierlich über (Abb. 8).

Diskussion

Bei der Umwandlung der Chordoblasten in blasige Chordazellen spielt das endoplasmatische Retikulum eine Rolle. Dieses Zellorganell ist stark ausgebildet und liefert die notwendigen Proteine zum Aufbau der Tonofilamente. Sie treten zuerst in unmittelbarer Nachbarschaft des endoplasmatischen Retikulums auf. Im Innern des Hohlraumsystems lassen sich keine Filamente nachweisen. Die Aggregation bestimmter Proteine zu Tonofilamenten geht also im Zytoplasma vor sich. Es werden so viele Filamente gebildet, daß dadurch eine deutlich ausgeprägte Rindenschicht im Zytoplasma entsteht. Sie liegt unter der Zellober-

flächenmembran, die erhalten bleibt. Deshalb muß sie der Grenze zugerechnet werden. Die Filamente entsprechen Tonofilamenten, die wahrscheinlich für die bekannte Doppelbrechung der lichtmikroskopisch sichtbaren Zellmembran verantwortlich sind. Nach histologischer Fixierung erkennbare Aggregate dieser Filamente können die streifige Zeichnung der „Membranen" bewirken, denn im frischen Zustand besitzt die Membran ein homogenes Aussehen. Es besteht kein Zweifel darüber, daß die 0,5 μ dicke filamentreiche Schicht unter der Zelloberflächenmembran die in der Lichtmikroskopie beschriebene Zellmembran ist. Nach unseren Befunden ist sie aber ein Zellteil, da sie unter der Zelloberflächenmembran liegt. Dafür spricht auch das Erhaltenbleiben der Desmosomen der Chordoblasten bei den blasigen Chordazellen. Solche Desmosomen sind elektronenmikroskopisch zuerst von Porter (1954) in der Epidermis von *Amblystoma* nachgewiesen worden. Später wurden sie noch in anderen Epithelien gefunden (z.B. Selby 1955, Säugetierepidermis; Sognnaes et al. 1956, orale Mukosa; Vogel 1958, Portioepithel; Odland 1958, normale menschliche Unterarmepidermis; Horstmann et al. 1958, Epidermis Rattenpfote; Fasske et al. 1959, Deckepithel der Mundschleimhaut; Horstmann 1960, Epidermis Mensch; Karrer 1960, Cervixepithel Mensch).

Der epithelartige Charakter des Chordaepithels bleibt auch bei seinen Abkömmlingen, den blasigen Chordazellen, erhalten. Die Einordnung des Chordagewebes in die Stützgewebe aus funktionellen Gründen ist zwar berechtigt, doch handelt es sich nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen um ein modifiziertes Epithel. Schaffer hat dem Chordagewebe in seiner Einteilung der Stützgewebe bereits eine besondere Stellung zugewiesen und die Unterschiede zwischen Chorda- und Knorpelgewebe hervorgehoben. Nach Schaffer ist das Chordagewebe aber auch kein Epithelgewebe, sondern eine Stützsubstanz eigener Art, die er in eine besondere Gruppe des sog. chordoiden Stützgewebes einreiht. Unsere elektronenmikroskopischen Untersuchungen haben den Epithelcharakter auch der großen blasigen Chordazellen zeigen können. Es liegen aber bis jetzt keine elektronenmikroskopischen Untersuchungen über die anderen chordoiden Stützgewebe vor, so daß nichts darüber gesagt werden kann, ob diese Gruppe der chordoiden Stützgewebe ein einheitlicher Gewebetypus ist.

Ein Zusammenhang zwischen endoplasmatischem Retikulum und Glykogensynthese wird von Millonig und Porter (1960) angenommen, die eine Vermehrung der granulafreien endoplasmatischen Vesiculae bei der Speicherung von Glykogen in Leberzellen sahen. In den Chordazellen gehen ebenfalls Veränderungen des endoplasmatischen Retikulums in der Nähe der glykogenhaltigen großen Zellblasen vor sich. Das verzweigte endoplasmatische Retikulum zerfällt in größere Vesiculae, die noch den typischen Granulabesatz aufweisen. Der weitere Zerfall in kleine Vesiculae geht schließlich mit einem Verlust der RNS-Granula einher. In der Nähe dieser Vesiculae treten die Glykogenkörnchen auf.

Zusammenfassung

Die Chordazellen von 30—40 cm langen Neunaugen *(Petromyzon)* wurden nach Osmium- und Kaliumpermanganatfixierung elektronenmikroskopisch untersucht. Das Chordaepithel (Chordoblasten) hat ein stark ausgeprägtes endoplasmatisches Retikulum mit Paladegranulabesatz, das an das Ergastoplasma von

eiweißsezernierenden Drüsenzellen erinnert. Dieses endoplasmatische Retikulum wird mit der Produktion von Tonofilamenten in Zusammenhang gebracht. In weiter zentralgelegenen Zellen werden die Tonofilamente dicht unter die Zelloberflächenmembran gelagert, so daß eine Zytoplasmarinde entsteht. Die Zellgrenzen liegen eng aneinander. Einzelne Kontaktstellen haben Desmosomen. Die blasigen Chordazellen besitzen eine stark ausgebildete Rindenschicht mit vielen Tonofilamenten, die unter der Zelloberflächenmembran liegt. Diese Rindenschicht ist dicker als 0,5 μ, damit im Lichtmikroskop sichtbar. Sie entspricht der sog. „Zellmembran" in den lichtmikroskopischen Untersuchungen. Im Innern dieser blasigen Zellen lassen sich nach Osmiumfixierung granuläre Elemente nachweisen, die sich nach Kaliumpermanganatfixierung oder Bleihydroxydkontrastierung als Glykogen darstellen. Ihre Produktion hängt auch mit dem endoplasmatischen Reticulum zusammen, das zuerst in größere Abschnitte zerfällt und dann noch seinen Paladegranulabesatz verliert. Auch die großen blasigen Zellen haben ihre Oberflächenmembran und Desmosomen. Sie müssen deshalb noch als *Epithelzellen* betrachtet werden.

Literatur

Duncan, R.: Electron microscope study of the embryonic neural tube and notochord. Tex. Rep. Biol. Med. **15**, 367—377 (1957).

Fasske, E., u. H. Themann: Über das Deckepithel der menschlichen Mundschleimhaut. Z. Zellforsch. **49**, 447—463 (1959).

Horstmann, E.: Die elektronenmikroskopische Struktur der Haut. Arch. klin. exp. Derm. **211**, 18—35 (1960).

—, u. A. Knoop: Elektronenmikroskopische Studien an der Epidermis. Z. Zellforsch. **47**, 348—362 (1958).

Karrer, H. E.: Cell interconnections in normal human cervical epithelium. J. biophys. biochem. Cytol. **7**, 181—185 (1960).

Leeson, T. S., and C. R. Leeson: Observations on the histochemistry and fine structure of the notochord in rabbit embryos. J. Anat. (Lond.) **92**, 278—285 (1958).

Millonig, G., and K. R. Porter: Structural elements of rat liver cells involved in glycogen metabolism. The Proc. of the European Reg. Conf. on Electron Microscopy Delft 1960 (ed. by A. L. Houwink and B. J. Spit) **2**, 655—659 (1961).

Odland, G. F.: The fine structure of the interrelationship of cells in human epidermis. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 529—538 (1958).

Schaffer, J.: Die Stützgewebe. In Handbuch der mikroskopischen Anatomie, Bd. II, Teil 2, herausgeg. von W. v. Möllendorff. Berlin: Springer 1930.

Selby, C. C.: An electron microscope study of the epidermis of mammalien skin in thin sections. J. biophys. biochem. Cytol. **1**, 429—445 (1955).

Sognnaes, R. F., and J. T. Albright: Preleminary observations on the fine structure of oral mucosa. Anat. Rec. **126**, 225—240 (1956).

Studnička, F. K.: Über das Vorhandensein von intrazellulären Verbindungen im Chordagewebe. Zool. Anz. **1897**, 286—293.

— Das Gewebe der Chorda dorsalis von Esox lucius L. (Eine Studie über die Umwandlung des Protoplasmas.) Z. Zellforsch. **13**, 566—650, 651—741 (1931).

Vogel, A.: Zum Feinbau der Interzellularbrücken nach Kontrastierung mit Phosphorwolframsäure. Verh. IV. Int. Kongr. Elektronenmikroskopie, Bd. II, S. 286—289, 1958. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.

Professor Dr. med. Willy Schwarz,
Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie an der Freien Universität Berlin,
Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Straße 15

Zeitschrift für Zellforschung 55, 610—616 (1961)

Aus der Abteilung für Gewebezüchtung am Max Planck-Institut für vergleichende Erbbiologie, Berlin-Dahlem

AUFNAHME VON JOD^{131} IN SCHILDDRÜSENGEWEBEKULTUREN BEI VERWENDUNG VERSCHIEDENER NÄHRMEDIEN

Von

Bodo Riedel

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 17. Juli 1961)

In einer früheren Arbeit haben wir beobachtet, daß Rollröhrchenkulturen von Kaninchenschilddrüsen nach einer Züchtungszeit von 3 Monaten eine PAS-positive Substanz bildeten. Wir hielten diese Substanz für Schilddrüsenkolloid, ließen aber offen, wieweit das Kolloid normal beschaffen ist (Knake und Riedel 1960). Inzwischen haben wir beobachtet, daß Schilddrüsengewebekulturen nach zehntägiger Züchtungszeit noch Thyroxin und Trijodthyronin aktiv in das Nährmedium freisetzen (Riedel 1961).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob Schilddrüsenkulturen J^{131} aufnehmen und nach welcher Züchtungszeit sie diese Funktion noch ausführen. Weiterhin interessierte es, ob die Höhe der J^{131}-Aufnahme von der Art des Nährmediums beeinflußt wird. In diesem Falle wäre zu klären, ob die Einflußnahme verschiedener Nährmedien mit morphischen Veränderungen in den Explantaten Hand in Hand geht.

A. Methoden

I. Züchtung der Gewebekulturen

Schilddrüsengewebe von 2000—3000 g schweren Kaninchen wurden in Rollröhrchen gezüchtet. Dazu wurden die Schilddrüsen in Streifen geschnitten ($3 \times 1 \times 1$ mm) und in Hühnerembryonalextrakt (HEE) aufgenommen. Sie wurden an die Wand von Rollröhrchen auf schon geronnene feste Phasen aus vier Teilen Hühnerplasma (HPl) und einem Teil HEE gesetzt. Drei Gewebestreifen ergaben eine Rollröhrchenkultur. Die Schilddrüsen von drei Kaninchen ergaben 70 Rollröhrchenkulturen.

Ebenso angesetzte Kulturen aus Nierenpapillen der gleichen Kaninchen dienten in allen Versuchen als Kontrollen.

Die flüssige Phase des Nährmediums bestand in dem einen Falle aus 2 ml einer Lösung von 5 g Lactalbumin und 1 g Hefeextrakt in 1000 ml Hanks-Lösung + 10% Kälberserum (LH-HL-KS) und in dem anderen Falle aus 2 ml einer Mischung von 50% menschlichem Ascites + 30% Hanks-Lösung + 20% HEE (A-HL-HEE). Antibiotika wurden in einer Konzentration von 50 γ Streptomycin und 100 iE Penicillin/ml Nährmedium zugesetzt. Gezüchtet wurde bei 35° C. Die Rollapparate drehten sich 12mal pro Stunde.

II. Zugabe von aktiver Jodlösung

Nach Ablauf verschieden langer Züchtungszeiten wurden pro Rollröhrchen 1 μC J^{131} steril und isotonisch zugesetzt. Die spezifische Aktivität der Ausgangslösungen wurde mit der Gerätekombination β, γ-Flüssigkeitszählrohr FHZ 44 und dem Strahlungsmeßgerät FH 49 bestimmt. Die Ausgangslösungen wurden dann so verdünnt, daß pro Rollröhrchenkultur eine Aktivität von 15000 Imp/min, das sind etwa 1 μC, zugegeben werden konnte. Das aktive Nährmedium blieb 24 Std auf den Kulturen.

III. Messung der in die Kulturen aufgenommenen J^{131}-Menge

Zur Messung der J^{131}-Aufnahme in die Kulturen wurden die Gewebestreifen mit Trypsin (Difco 1:250 in Phosphatpuffer, 1 Std bei 35° C) von der festen Phase abgelöst. Dann wurden die freischwimmenden Gewebestreifen mit einem Starmesser aus den Rollröhrchen herausgenommen und auf vorher getrocknete und gewogene Aluminiumfolien übertragen. Die Aluminiumfolien mit den Geweben wurden dann 12—14 Std lang bei 80° C getrocknet, 1 Std lang bei Zimmertemperatur in den Exsikkator gebracht und schließlich gewogen. Anschließend wurde die von den Geweben abgegebene Strahlung mit dem Methandurchflußzähler FH 407 und dem Strahlungsmeßgerät FH 49 gemessen. Es wurde schließlich die spezifische Aktivität der Gewebe (Imp/min/mg Gewebstrockengewicht) berechnet.

B. Versuchsanlage

I. Zur Messung der J^{131}-Aufnahme

Wir führten drei Versuche durch mit je 110 Rollröhrchenkulturen, 70 Schilddrüsen- und 40 Nierenpapillenkulturen. Im ersten Versuch wurden 35 Schilddrüsen- und 20 Nierenpapillenkulturen gleich nach dem Ansetzen mit J^{131}-haltigem Nährmedium versehen (Versuch „0 Tage"), die anderen 35 Schilddrüsen- und 20 Nierenpapillenkulturen erst nach 15tägiger Züchtungszeit (Versuch „15 Tage"). Beide Gruppen stammten aus demselben Ansatz. Während wir die Nierenpapillenkulturen alle in LH-HL-KS züchteten, wurden von den 35 Schilddrüsenkulturen 17 Kulturen in LH-HL-KS und 18 Kulturen in A-HL-HEE gezüchtet. In dem 2. Versuch wurden die aus einem Ansatz stammenden Kulturen zur Hälfte nach fünf und zur anderen Hälfte nach 23 Tagen untersucht, im dritten Versuch nach 10 und 30 Tagen (Tabelle).

Tabelle. *Anordnung der Versuche 1—3*

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
70 Schilddrüsenkulturen: 35 Schilddrüsenkulturen → 18 A-HL-HEE	0 Tage	5 Tage	10 Tage
70 Schilddrüsenkulturen: 35 Schilddrüsenkulturen → 17 LH-HL-KS	und	und	und
70 Schilddrüsenkulturen: 35 Schilddrüsenkulturen → 18 A-HL-HEE	15 Tage	23 Tage	30 Tage
70 Schilddrüsenkulturen: 35 Schilddrüsenkulturen → 17 LH-HL-KS			
40 Nierenkulturen → 20 LH-HL-KS	0 Tage	5 Tage	10 Tage
40 Nierenkulturen → 20 LH-HL-KS	und 15 Tage	und 23 Tage	und 30 Tage

In einem vierten Versuch wurden 20 Schilddrüsenkulturen und 20 Nierenpapillenkulturen nach 3 Monate dauernder Züchtung darauf untersucht, ob sie noch J^{131} aufnehmen. Das Nährmedium war A-HL-HEE.

II. Zur histologischen Untersuchung

In einem fünften Versuch wurden Schilddrüsenkulturen wie oben beschrieben angesetzt. Acht Kulturen wurden in A-HL-HEE und 16 Kulturen in LH-HL-KS gezüchtet. Nach 8 Tagen wurden acht in LH-HL-KS gezüchtete Kulturen histologisch aufgearbeitet und nach insgesamt 15 Tagen die restlichen Kulturen, acht in LH-HL-KS und acht in A-HL-HEE gezüchtete.

Zur histologischen Untersuchung wurden die Gewebe in Carnoy fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Schnitte wurden mit H.-E. und nach Azan gefärbt. Zur Darstellung des Kolloids wurde die PAS-Reaktion nach McManus-Hotchkiss ausgeführt.

C. Ergebnisse

I. Die J^{131}-Aufnahme der Schilddrüsen- und Nierenkulturen

In Abb. 1 ist die J^{131}-Aufnahme der in LH-HL-KS und A-HL-HEE gezüchteten Schilddrüsenkulturen von verschiedenem Alter und der entsprechenden Nierenkontrollen dargestellt. Man sieht, daß die in LH-HL-KS gezüchteten Schilddrüsengewebe zum Zeitpunkt der Explantation wenig mehr J^{131} aufnehmen, als die in A-HL-HEE gezüchteten Kulturen. Im Verlauf einer Züchtungszeit von 15 Tagen fällt dann die J^{131}-Aufnahme der in LH-HL-KS gezüchteten Schilddrüsen auf die Werte der Nierenkontrollen ab. Im Gegensatz dazu bleibt die J^{131}-Aufnahme bei Züchtung in A-HL-HEE 30 Tage lang unverändert hoch (Versuch 1—3). Sogar nach 3 Monaten lagern diese Kulturen noch etwa das 20fache der Nierenkontrollen ein (Versuch 4).

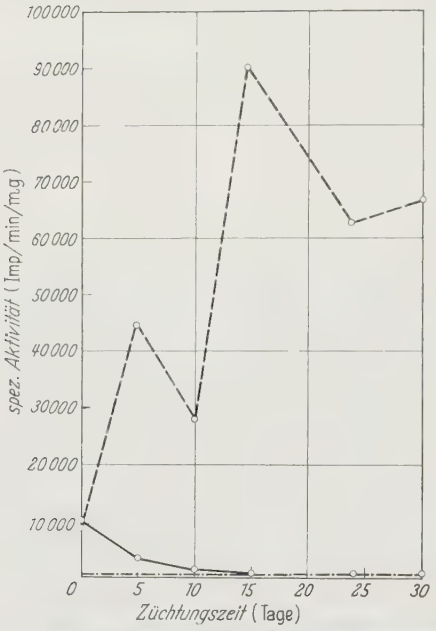


Abb. 1. Graphische Darstellung der J^{131}-Aufnahme in Schilddrüsen- und Nierenkulturen. — — Schilddrüse A-HL-HEE; —— Schilddrüse LH-HL-KS; —·— Niere LH-HL-KS

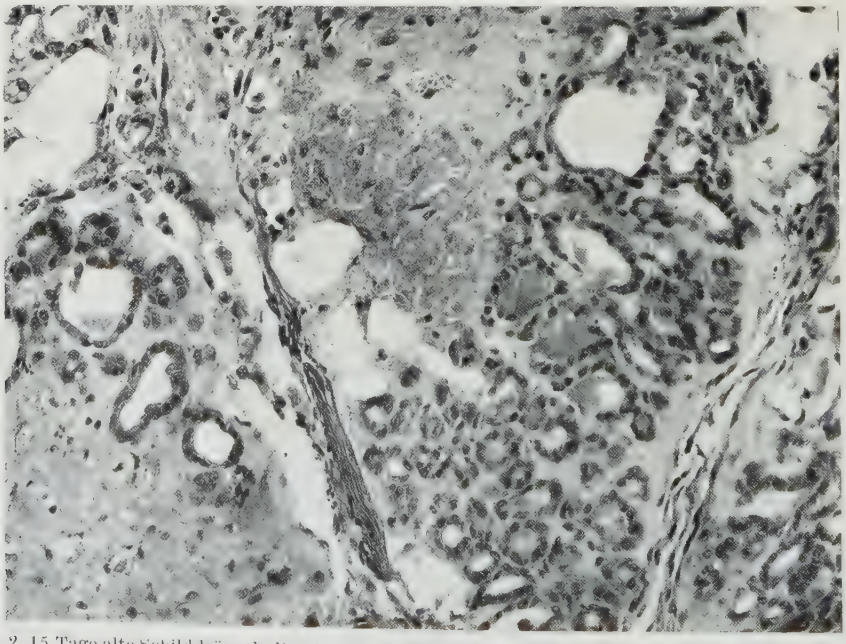


Abb. 2. 15 Tage alte Schilddrüsenkultur (A-HL-HEE), 200fach, H.-E. Neben einer großflächigen Nekrose mit wenig Spindelzellen guterhaltene Follikel mit oder ohne Kolloid im Lumen. Einzelne Follikel mit Proliferationsknospen, Kapillaren

II. Histologische Befunde der Schilddrüsenkulturen

1. Nach 15 Tage dauernder Züchtung in A-HL-HEE. *a) Mutterstücke.* In den Mutterstücken ist der Follikelaufbau aus einschichtigem, kubischen Epithel, Gitterfasernetz und funktionslosen Kapillaren teilweise gut erhalten. Die Follikelmantelzellen liegen meistens schlüssig. Die meisten Follikel enthalten Kolloid. Unregelmäßigkeiten des Epithelbelags sind selten. Am Übergang des Mutterstückes in die Wachstumszone liegen Follikel, die durch Zellproliferation verändert sind. Sie tragen Knospen, die dem Follikellumen zugewandt sind oder

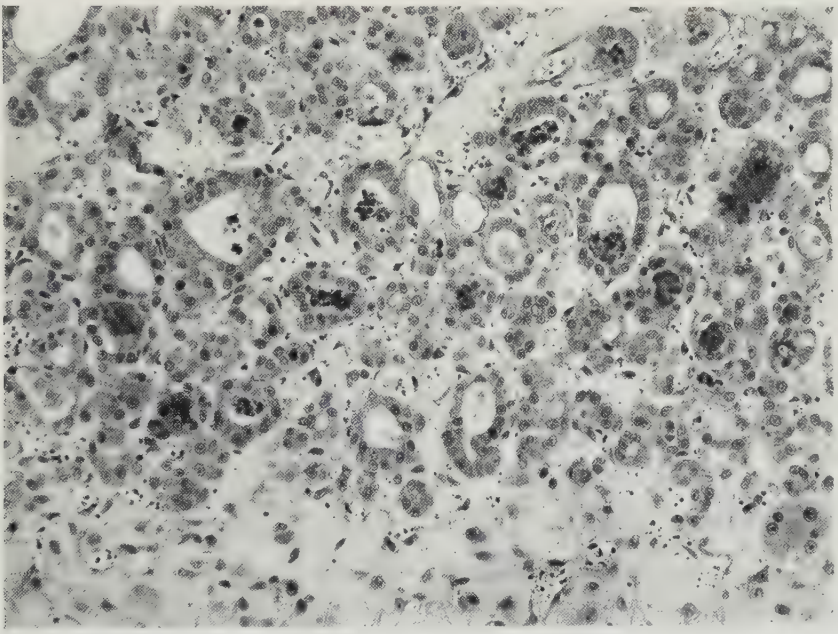


Abb. 3. 15 Tage alte Schilddrüsenkultur (LH-HL-KS), 200fach, H.-E. Follikel mit einschichtigem Epithel und ins Lumen abgeschilferten Zellen. Daneben regelrechte Follikel und solche mit Proliferationsknospen. Fünfkernige Riesenzelle. Zwischen den Follikeln Kapillaren

auch in das umgebende Bindegewebe eindringen. Stellenweise finden sich statt Follikeln ausgedehnte Nekrosen. Hier liegen nur wenige Spindelzellen in einer scholligen, eosinophilen Substanz. Vereinzelt sind 3—6kernige Riesenzellen anzutreffen (Abb. 2).

b) Wachstumszonen. Hier sind die Zellen längsoval bis spindelförmig. Sie liegen pflastersteinartig dicht beieinander oder auch weiter auseinander. Die Kerne sind gewöhnlich unregelmäßig hinsichtlich Form, Größe und Färbbarkeit.

2. Nach 15 Tage dauernder Züchtung in LH-HL-KS. *a) Mutterstücke.* Es finden sich Schilddrüsenstrukturen, nämlich Follikel mit Gitterfaserkorb und funktionslosen Kapillaren. Nur wenige dieser Follikel sind normal gestaltet. Die meisten zeigen gewisse Besonderheiten: Man findet Follikel mit hochzylindrischem, oft mehrreihigem oder sogar mehrschichtigem Epithel, das dunkelrot gefärbtes Kolloid (Azan) umschließt. Im Kolloid liegen viele Zellen mit pyknotischen Kernen. Die apikalen Pole der Zellen tragen einen Bürstensaum. In anderen Follikeln haben die Mantelzellen statt des Bürstensaumes kleine, pilzförmige

Zotten, die in das Kolloid vorspringen. Schließlich gibt es noch Follikel, die von proliferierenden Zellen solide ausgefüllt sind. Andere sind strangartig deformiert. Derartige Gebilde finden sich in der Nähe der Wachstumszone. Ein- und mehrkernige Riesenzellen sind sehr häufig (Abb. 3).

b) Wachstumszonen. Die Wachstumszonen gleichen in Ausdehnung und Beschaffenheit denen der vorher beschriebenen Kulturen.

3. Nach 8 Tage dauernder Züchtung in LH-HL-KS. *a) Mutterstücke.* Hier finden sich regelrechte Follikel mit kubischem Epithel und blau-granulärem (Azan) Kolloid. Andere Follikel haben stark hypertrophierte Mantelzellen. Ihre Lumina sind stark eingeengt. An Follikeln mit rot gefärbtem Kolloid (Azan) und hohem Epithel können Epithelabschilferungen ins Follikellumen beobachtet werden. Solide Ausfüllung von Follikeln mit Zellen oder auch strangartiges Wachstum sind zu sehen. Einkernige und mehrkernige Riesenzellen sind selten.

b) Wachstumszonen. Die Wachstumszonen gleichen denen der oben beschriebenen Kulturen.

D. Diskussion

I. Deutung der verschieden hohen J^{131}-Aufnahme der Schilddrüsengewebe nach dem histologischen Bild

Wie oben dargestellt, wird die J^{131}-Aufnahme gezüchteter Schilddrüsenzellen durch verschiedene Nährmedien beeinflußt. Es sollte geklärt werden, ob der beobachtete Effekt parallel zu morphischen Unterschieden geht. Der histologische Vergleich der in A-HL-HEE und in LH-HL-KS gezüchteten Schilddrüsenkulturen ergab tatsächlich gewisse morphische Unterschiede zwischen beiden Versuchsreihen. Ihr Ausmaß war jedoch so gering, daß die verschieden hohe J^{131}-Aufnahme beider Gewebekulturarten nur mit Vorbehalt darauf bezogen werden kann. Ein Zusammenhang könnte etwa in folgendem bestehen:

In beiden Fällen waren nach 15tägiger Züchtungszeit noch Follikel vorhanden, die durch Zellproliferationen z.T. in typischer Weise verändert waren. Eine Besonderheit der in LH-HL-KS gezüchteten Schilddrüsen bestand in einer starken Epithelabschilferung in das Follikellumen. Die Epithelabschilferung hat ein Ersatzwachstum zur Folge. Man könnte nun denken, daß die wiederholten Zellteilungen zu einer funktionellen Entdifferenzierung der Mantelzellen geführt haben. Dadurch würde die in diesem Nährmedium nach kurzer Züchtungszeit ausbleibende J^{131}-Aufnahme verständlich.

II. Abhängigkeit der J^{131}-Aufnahme von der Beschaffenheit des Nährmediums

Außerdem ist daran zu denken, daß die Jodaufnahme in die Schilddrüsenzelle ein energieabhängiger Vorgang ist. Die Züchtung der Schilddrüsenzellen in einem nährstoffärmeren oder weniger gut assimilierbaren Nährmedium könnte eine verminderte Jodaufnahme zur Folge haben. In diesem Fall müßte sich die herabgesetzte J^{131}-Aufnahme sogleich nach der Explantation des Gewebes zeigen. Bei unseren Versuchen war die J^{131}-Aufnahme in A-HL-HEE und in LH-HL-KS gezüchteter Gewebekulturen bei J^{131}-Zugabe gleich nach der Explantation annähernd gleich hoch (Abb. 1). Sie fiel bei Züchtung in LH-HL-KS erst nach einer Züchtungszeit von 15 Tagen auf die Werte der Nierenkontrollen ab.

Es ist also festzustellen, daß der beobachtete Effekt kaum einem etwa geringeren Nährstoffgehalt des Nährmediums zuzuschreiben ist, sondern wahrscheinlich auf eine protrahierte Stoffwechselschädigung der gezüchteten Zellen hinweist. Bei Züchtung der Schilddrüsengewebe in LH-HL-KS blieb zwar das Teilungsvermögen der Zellen erhalten, doch verloren sie die Fähigkeit zur J^{131}-Aufnahme.

III. Züchtungszeit und J^{131}-Aufnahme

Im Gegensatz zu den in LH-HL-KS gezüchteten Schilddrüsenkulturen blieb die J^{131}-Aufnahme der in A-HL-HEE gezüchteten Kulturen 30 Tage lang unverändert sehr hoch. Drei Monate alte A-HL-HEE-Kulturen lagerten noch etwa das 20fache der Nierenkontrollen ein. Pavlović (1955) beschrieb ebenfalls J^{131}-Aufnahme bei Schilddrüsenkulturen. Ihre nach der Uhrglasmethode 63 Tage lang gezüchteten Kulturen lagerten noch J^{131} ein.

IV. Bedeutung der Follikelstruktur für die J^{131}-Aufnahme

An Hand autoradiographischer Untersuchungen stellte M. R. Pavlović (1955) fest, daß J^{131} im Follikellumen gespeichert wird. Nur Schilddrüsengewebe, in denen die Follikelstruktur erhalten war, lagerten J^{131} ein. Oppenheimer u. Mitarb. (1956) beobachteten ebenfalls, daß die Follikelanordnung für die Schilddrüsenfunktion notwendig ist. Über den membranartigen epithelialen Wachstumszonen fanden die Autoren keine Schwärzung ihrer Autoradiographiefilme. Embryonale Schilddrüsen ohne Follikelstruktur entwickelten diese in vitro in dem gleichen Maße wie in vivo. Sie speicherten erst J^{131}, wenn die Follikelanordnung hergestellt war (Carpenter u. Mitarb. 1954). Levenson (1960) untersuchte Rattenschilddrüsen mit J^{131} und fand vermittels Autoradiographie der Schnitte die meiste Radioaktivität am inneren Saum der Mantelzellen lokalisiert.

Aus den genannten Beispielen geht hervor, welche Bedeutung andere Autoren der Follikelstruktur für die J^{131}-Aufnahme in die Schilddrüsenzellen beimessen. In diesem Zusammenhang sind unsere Ergebnisse mit lange gezüchteten Schilddrüsenkulturen besonders bemerkenswert. Solche Kulturen lagerten noch nach 3 Monaten beträchtliche Mengen J^{131} ein. Nach dreimonatiger Züchtung sind aber die Follikelstrukturen in den Kulturen schon aufgelöst (Knake und Riedel 1960). Hier steht allein die epitheliale Wachstumszone und das umgebaute Mutterstück ohne Follikel für die J^{131}-Aufnahme zur Verfügung. Dieser Befund steht im Widerspruch zu den Erfahrungen der genannten Autoren. Aus unseren Versuchen ist einerseits zu entnehmen, daß Schilddrüsenkulturen, in denen die Follikelstruktur zerstört ist, J^{131} aufnehmen können. Andererseits bedeutet das Erhaltensein der Follikelanordnung nicht, daß die J^{131}-Aufnahme ungehindert vonstatten geht.

Zusammenfassung

1. Mit A-HL-HEE (menschlicher Ascites + Hanks-Lösung + Hühnerembryonalextrakt) gezüchtete Rollröhrchenkulturen von Kaninchenschilddrüsen lagern nach 3 Monate dauernder Züchtungszeit noch 20mal soviel J^{131} wie die als Kontrollen gezüchteten Nierenkulturen ein. Die J^{131}-Aufnahme in LH-HL-KS (Lactalbumin-Hefe-Hankslösung + Kälberserum) gezüchteter Schilddrüsenkulturen hält nur 10 Tage an. Sie ist wesentlich geringer als die der zuerst genannten Kulturen. Am 15. Züchtungstag ist die J^{131}-Aufnahme dieser Kulturen auf die

Werte der Nierenkontrollen abgefallen. Mögliche Zusammenhänge zwischen fehlender J^{131}-Aufnahme und dem histologischen Bild der Explantate werden diskutiert.

2. Zur Erklärung wird angenommen, daß es unter dem Einfluß des LH-HL-KS zu einer protrahierten Stoffwechselschädigung kommt. Während die Zellteilungsvorgänge nicht getroffen werden, erlahmt die J^{131}-Aufnahme.

3. Erhaltung der Follikelstruktur bedeutet nicht Fähigkeit zur J^{131}-Aufnahme. Andererseits ist für den Vorgang der J^{131}-Aufnahme die Follikelstruktur nicht unbedingt notwendig.

Literatur

Carpenter, E., J. Beattie and R. D. Chambers: The uptake of J^{131} by embryonic chick thyroid glands in vivo and in vitro. J. exp. Zool. **127**, 249—270 (1954).

Knake, E. u. B. Riedel: Organstruktur und Zellfunktion in explantiertem und später autoretransplantiertem Schilddrüsengewebe. Z. Zellforsch. **52**, 408—426 (1960).

Levenson, V. J.: The site of the synthesis of protein-bound iodine in the thyroid gland. Bull. exp. Biol. Med. **49**, 51—53 (1960).

Oppenheimer, J. H., J. R. Tata and R. W. Rawson: Morphological and functional studies of thyroid tissue cultures. Exp. Cell Res. **11**, 368—377 (1956).

Pavlović, M. R.: Uptake of J^{131} by the thyroid of the infantile rat after prolonged in vitro cultivation. J. Endocr. **12**, 227—230 (1955).

Riedel, B.: Radiopapierchromatographischer Nachweis der aktiven Freisetzung von Schilddrüsenhormon in der Gewebekultur. Z. Naturforsch. (1961, im Druck).

Dr. Bodo Riedel, Berlin-Dahlem, Garystr. 9

Aufnahmebedingungen

I. Sachliche Anforderungen

1. Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören.

2. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigungen bereits anerkannter Befunde können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Dasselbe gilt von Versuchen und Beobachtungen, die ein positives Resultat nicht ergeben haben. Arbeiten, rein referierenden Inhalts werden abgelehnt, vorläufige Mitteilungen nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellung der Tatbestände ist zulässig. Aufsätze spekulativen Inhalts sind nur dann geeignet, wenn sie durch neue Gesichtspunkte die Forschung anregen.

II. Formelle Anforderungen

1. Das Manuskript muß leicht leserlich (möglichst in Maschinenschrift) geschrieben sein. Die Abbildungsvorlagen sind auf besonderen Blättern beizufügen. Diktierte Arbeiten bedürfen der stilistischen Durcharbeitung zwecks Vermeidung von weitschweifiger und unsorgfältiger Darstellung. Absätze sind nur zulässig, wenn mit ihnen ein neuer Gedankengang beginnt.

2. Die Arbeiten müssen *kurz* und stilistisch einwandfrei geschrieben sein. Ausführliche historische Einleitungen sind zu vermeiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargelegt werden. Der Anschluß an frühere Behandlungen des Themas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen (in Monographien, „Ergebnissen", Handbüchern) herzustellen.

3. Der Weg, auf dem die Resultate gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Darstellung der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.

4. Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenfassung (höchstens 1 Seite) der wesentlichen Ergebnisse anzufügen, die in einer der Kongreßsprachen abgefaßt sein kann.

5. Von jeder Versuchsart bzw. jedem Tatsachenbestand ist in der Regel nur *ein* Protokoll im Telegrammstil als Beispiel in knappster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial kann im Text oder, wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber umfangreiche tabellarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden. Es wird empfohlen, durch eine Fußnote daraufhinzuweisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen oder angefordert werden kann.

6. Die *Abbildungen* sind auf das unbedingt Notwendige zu beschränken. Kurven, Diagramme usw., die nur zur Illustration von Befunden dienen und ohne weiteres im Text beschrieben werden können, werden zurückgewiesen. Knappe, klare Abbildungsunterschriften (Legenden) erübrigen nochmalige Beschreibung im Text. Sie sind getrennt von den Abbildungen dem Manuskript im Anschluß an das Literaturverzeichnis beizufügen. Unzulässig ist die *doppelte* Darstellung in Abbildung *und* Kurve. Bereits veröffentlichte Abbildungen können nicht wiederholt werden. Ausnahmen hiervon sind nur in besonders begründeten Fällen möglich. *Farbige* Bilder können in der Regel keine Aufnahme finden. Für Kurven oder Schwarzweißzeichnungen, die als Strichätzung reproduziert werden können, genügt die Ablieferung sauberer, klarer Skizzen, die vom Verlag umgezeichnet werden. Bei Halbtonbildern (Photos, Mikrophotos, Halbtonzeichnungen) sind saubere, scharfe und tonwertreiche Originalvorlagen (Hochglanzabzüge von Originalphotographien) notwendig. Besondere Wünsche des Autors hinsichtlich des linearen Verkleinerungs- und Vergrößerungsmaßstabes der Vorlagen sollen vermerkt werden.

Die *Beschriftung* der Abbildungen mit Buchstaben oder Ziffern erfolgt durch den Verlag. Die Hinweise hierfür sollen keinesfalls in der Abbildung selbst, sondern auf einem darüberliegenden transparenten Deckblatt angegeben werden. Dort sind auch Abstriche oder gewünschte Bildausschnitte zu bezeichnen. Hinweispfeile oder -linien sind ebenfalls auf dem Deckblatt anzubringen, wobei die Endpunkte durch Einstich mit einer feinen Nadel auf der darunterliegenden Originalvorlage fixiert werden sollen. Es empfiehlt sich ferner, auf dem Deckblatt wichtige Abbildungspartien zu kennzeichnen, damit die Kunstanstalt bei der Ätzung ihr besonderes Augenmerk darauf richten kann.

7. Literaturangaben sollen Autorennamen, vollständigen Titel der Arbeit, Zeitschrift, Band- und Seitenzahl sowie Jahreszahl umfassen [z. B. Böke, W.: Untersuchungen des Linsenepithels mit dem Phasenkontrastmikroskop. Z. Zellforsch. *38*, 428—454 (1953)]. Die Literaturangaben sind am Schluß der Arbeit nach den Autorennamen alphabetisch anzuordnen und nicht zu numerieren. Werden mehrere Arbeiten des gleichen Autors zitiert, so ist an der betreffenden Stelle im Text eine in Klammern gesetzte 1, 2 bzw. 3 hinter dem Autorennamen einzufügen. Im Literaturverzeichnis steht diese Zahl, ebenfalls in Klammern gesetzt, vor der betreffenden Arbeit. Bücher müssen mit vollem Titel, Auflage, Ort, Verlag und Jahr zitiert werden.

8. Methodik, Protokolle und weniger wichtige Teile des Textes sind für *Kleindruck* vorzumerken. Die Lesbarkeit des Wesentlichen wird hierdurch gehoben.

9. Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Autoren in Ober- und Untertitel einer Arbeit nicht die gleichen sind.

10. An *Dissertationen*, soweit deren Aufnahme überhaupt zulässig erscheint, werden nach Form und Inhalt dieselben Anforderungen gestellt wie an andere Arbeiten. Danksagungen an Institutsleiter, Dozenten usw. werden nicht abgedruckt. Zulässig sind einzeilige Fußnoten mit der Mitteilung, wer die Arbeit angeregt und geleitet oder wer die Mittel dazu gegeben hat. *Festschriften* und *Monographien* gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.

Stammesgeschichte der Säugetiere

Eine Übersicht
über Tatsachen und Probleme der Evolution der Säugetiere

Von Professor Dr. ERICH THENIUS,
Paläontologisches Institut der Universität Wien,
und Professor Dr. HELMUT HOFER,
Max Planck-Institut für Hirnforschung, Gießen

Mit 53 Abbildungen und 2 Tabellen. VI, 322 Seiten Gr.-8°. 1960. Ganzleinen DM 79,—

AUS DEN BESPRECHUNGEN

„... Das vorliegende Werk ist von einem paläontologisch erfahrenen vergleichenden Anatomen in Zusammenarbeit mit einem morphologisch gebildeten Paläontologen geschrieben worden. Die beiden Autoren ergänzen sich in glücklichster Weise und schufen ein Werk von schöner Einheitlichkeit, das ein Kernproblem der modernen Evolutionsforschung von hoher Warte zusammenfassend schildert. Eine derartige Zusammenfassung fehlte bisher im deutschsprachigen Schrifttum vollständig. Es ist besonders hervorzuheben, daß die Darstellung knapp und in keiner Weise weitschweifig ist. Alle wesentlichen Befunde und Probleme werden trotzdem in streng wissenschaftlicher Weise, aber in verständiger und klarer Sprache dargeboten ... Das Buch kann vorbehaltlos empfohlen werden. Es handelt sich um ein fachwissenschaftliches Buch, das trotzdem nicht in obskurer Sprache geschrieben ist und daher geeignet ist, auch als Einführung für Studierende und als Informationsquelle für Vertreter von Nachbarfächern nützliche Dienste zu leisten ..." *Zeitschrift für Säugetierkunde*

SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg
Printed in Germany